

Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

"La proteína Bcl2 mitiga la sobrecarga de calcio mitocondrial y la actividad de los canales L en células PC12"

TESIS DOCTORAL

MARIA NATACHA DIAZ PRIETO
Madrid, 2007

1. ABREVIATURAS.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1. El Ca^{2+} como segundo mensajero.....	7
2.1.1. Mecanismos de entrada Ca^{2+}	7
2.1.1.1. Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.....	7
2.1.2. Mecanismos de extrusión de Ca^{2+}	11
2.2. El Ca^{2+} en la muerte celular	13
2.2.1. El Ca^{2+} , la mitocondria y la apoptosis.....	14
2.2.1.1. Mecanismos moleculares de la apoptosis.....	15
2.3. La familia Bcl2.....	16
2.4. Estructura de Bcl2 y otros miembros de la familia.....	17
2.5. Bcl2 como formador de canales.....	19
2.6. Influencia de Bcl2 sobre la homeostasis del Ca^{2+}	21
2.7. Bcl2 en la epilepsia.....	23
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1. Células PC12.....	29
4.1.1. Características del modelo celular.....	29
4.1.2. Mantenimiento del cultivo celular.....	31
4.2. Determinación de los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ con la proteína bioluminiscente eucorina.....	31
4.2.1. Fundamento.....	31
4.2.2. Estructura y funcionamiento de la eucorina.....	32
4.2.3. Calibrado de la AEQ.....	33
4.2.4. Procedimiento experimental para la expresión y reconstitución de la AEQ en las células PC12.....	34
4.3. Determinación de la expresión de Bcl2.....	36
4.3.1. Detección de la expresión de Bcl2 por western blot.....	36
4.3.2. Inmunofluorescencia.....	38
4.4. Registros electrofisiológicos ("patch clamp").....	38
4.4.1. Registro de las corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) en configuración de célula entera y fijación de voltaje.....	40
4.5. Análisis estadístico.....	42

5. RESULTADOS.....	43
5.1. Determinación de la expresión de la proteína Bcl2 en células PC12.....	44
5.2. Monitorización de la $[Ca^{2+}]_c$ en células Control y Bcl2.....	45
5.3. Monitorización de la $[Ca^{2+}]_m$ con Mit-mut-AEQ en células Control y Bcl2.....	47
5.4. Efectos de la cafeína sobre la $[Ca^{2+}]_m$ en células Control y Bcl2.....	48
5.5. Efectos de Bcl2 sobre la capacidad tamponadora de Ca^{2+} de la mitocondria.....	50
5.6. Efectos de Bcl2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través del canal del subtipo L en células Control y Bcl2.....	57
5.7. Efecto de la elevación de la $[Ca^{2+}]_c$ en la distribución de Bcl2 y canal L (α_{1D}) en células Control y Bcl2.....	60
5.8. Incremento por ionomicina de la $[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_m$ en células Control y Bcl2.....	63
5.9. Efecto de la despolarización con alto K^+ en células PC12 con expresión transitoria de Bcl2.....	65
5.10. Corrientes de entrada de Ca^{2+} en células Control y Bcl2.....	66
5.11. Medida del potencial de membrana en reposo y en presencia de alto K^+ extracelular en células Control y Bcl2.....	70
5.12. Determinación de la expresión de la proteína Bcl2 en pacientes epilépticos resistentes a la medicación antiepiléptica.....	71
6. DISCUSIÓN.....	74
6.1. Línea celular PC12 y clones estables de Bcl2.....	75
6.2. Efecto de Bcl2 sobre el Ca^{2+} citosólico, mitocondrial y reticular.....	76
6.3. Efecto de Bcl2 sobre la captación mitocondrial de Ca^{2+}	78
6.4. Efecto de Bcl2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los CCVD de la membrana plasmática.....	79
6.5. Implicación clínica de la expresión de Bcl2 en pacientes epilépticos.....	84
7. CONCLUSIONES.....	87
8. BIBLIOGRAFÍA.....	89

1. Abreviaturas

$\Delta\psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

$[Ca^{2+}]_c$: Concentración de Ca^{2+} en el citoplasma

$[Ca^{2+}]_i$: Concentración de Ca^{2+} en la solución intracelular

$[Ca^{2+}]_M$: Concentración de Ca^{2+} en la mitocondria

$[Ca^{2+}]_{RE}$: Concentración de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEQ: Ecuorina

ANOVA: Análisis de la varianza

APAF-1: Factor activador de proteasas apoptóticas 1

ApoAEQ: Apoecuorina

ATP: Adenosín-5'-trifosfato

Bcl2: del inglés B-Cell Lymphoma 2, proteína Bcl2

BH: del inglés Bcl2 Homology, dominio de homología con Bcl2

BSA: Albúmina sérica bovina

c-ADN: ADN copia

CCVD: Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes

Cit-AEQ: Ecuorina citosólica

COX VIII: Subunidad 8 de la citocromo C oxidasa humana

CTRL: Control

CX: Corteza

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

EGTA: Ácido etilenglicol-bis (beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético

Em: Potencial de membrana

FCCP: Carbonil cianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona

GTP: Guanosín-5'-trifosfato

HEPES: (N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico])

HPC: Hipocampo

I_{Ca}: Corriente de Ca²⁺

IP₃: Inositol 1, 4, 5-trifosfato

m-ARN: Acido ribonucleico mensajero

Mit-mut-AEQ: Ecuorina mitocondrial mutada

NCX: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

NGF: Factor de crecimiento neural

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NMG: Células No Modificadas Geneticamente

PMCA: Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática

PPTM: Poro de permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial

RE: Retículo endoplásmico

RE-AEQ: Ecuorina del retículo endoplásmico

RIP₃: Receptor de IP₃

RRy: Receptor de rianodina

SBF: Suero bovino fetal

SC: Suero de caballo

SE: Status epilepticus

SERCA: Ca²⁺-ATPasa del retículo endoplásmico

TBI: del inglés Traumatic Brain Injury, daño traumático cerebral

TEA: Tetra-etil amonio

2. Introducción

2.1 El Ca^{2+} como segundo mensajero

El Ca^{2+} es una señal intracelular muy versátil que puede originar gran cantidad de respuestas por parte de las células, tan diversas como la exocitosis de un neurotransmisor en el sistema nervioso, la contracción de músculos o la activación de la transcripción génica (Berridge y col., 2003).

La concentración de calcio citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) depende en cada momento de la cantidad de Ca^{2+} que entra en la célula, principalmente desde el exterior celular, y de la cantidad de Ca^{2+} que es retirado por los mecanismos de extrusión de Ca^{2+} de que dispone la célula, bien a los depósitos intracelulares o al exterior celular (Berridge y col., 2003). Los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ oscilan entre el 100 nM de la célula en reposo y el 1 μM cuando la célula está activada. El tipo de respuesta no está condicionado únicamente por la intensidad del incremento de Ca^{2+} sino que también son factores importantes la forma de la señal, su duración y su distribución temporal. No generan iguales respuestas una señal de μs de duración que una señal que dura minutos u horas.

La señal intracelular de Ca^{2+} es por tanto un potente estímulo para las células y al estar implicado en gran cantidad de procesos tan distintos entre sí, ha de estar también finamente regulado con el fin de no provocar efectos indeseados. Para ello, la célula dispone de una compleja maquinaria para mantener la homeostasia del Ca^{2+} en niveles fisiológicos (Berridge y col., 2003)

2.1.1 Mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+}

2.1.1.1 Mecanismos de entrada de Ca^{2+}

Las vías de entrada de Ca^{2+} al citosol celular pueden ser a través de la membrana plasmática (Ca^{2+} extracelular) o bien de depósitos intracelulares. La entrada de Ca^{2+} desde el exterior es a favor de gradiente electroquímico a través de la activación de distintos tipos de canales o receptores de membrana.

La entrada de Ca^{2+} puede ser a través de:

- Canales iónicos
- Receptores acoplados a canales iónicos (receptor de glutamato de tipo NMDA, receptor nicotínico de acetilcolina)
- Receptores acoplados a segundos mensajeros, que a través de la acción de éstos aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Receptor de glutamato tipo AMPA, receptor de glutamato tipo kainato).

La segunda fuente de entrada de Ca^{2+} al citosol para la señalización intracelular es el Ca^{2+} acumulado en depósitos intracelulares. El Ca^{2+} se libera al citosol a través canales presentes en la membrana del retículo endoplásmico que son los conocidos como receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (RIP_3), sensibles al segundo mensajero inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y receptores de rianodina (RRy), sensibles a cafeína y al alcaloide rianodina. Ambos tipos de canales son sensibles a Ca^{2+} , aumentando la liberación Ca^{2+} en su presencia en un mecanismo que se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

2.1.1.1.1 Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes

Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD) son una familia de complejos proteicos que se encuentran en las membranas de células excitables. Están formados por una subunidad α_1 y por otras subunidades auxiliares o reguladoras de la actividad del canal, llamadas α_2/δ , β y γ (Curtis y Catterall, 1984; Chin, 1998; García y col., 2000; Garcia y col., 2006; Gandía y col., 1995) (**Figura 1**).

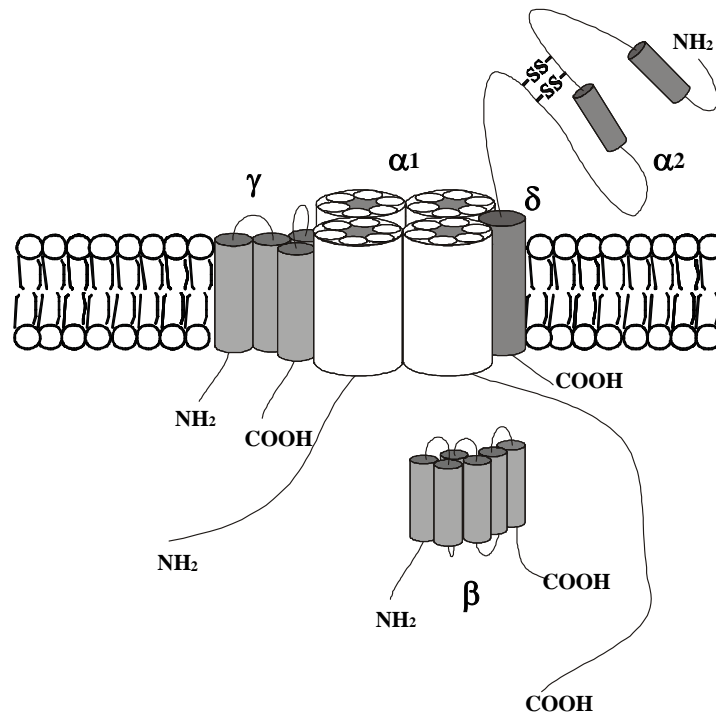


Figura 1: Estructura típica de un canal de Ca^{2+} voltaje dependiente

La subunidad α_1 es la encargada de formar el poro iónico a través del cual pasa el ión Ca^{2+} , así como el lugar de unión de los diferentes fármacos agonistas y antagonistas conocidos. El resto de subunidades que forman el canal (α_2/δ , β , γ) son subunidades auxiliares y/o reguladoras de la actividad del canal (Curtis y Catterall, 1984; Chin, 1998; García y col., 2000).

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se clasifican en función de su rango de activación en dos subgrupos principales:

- Canales de bajo umbral de activación (tipo T)
- Canales de alto umbral de activación (tipos L, N, P/Q y R)

Canales de bajo umbral de activación:

Dentro de este grupo solo se ha identificado un subtipo de canal, el subtipo T (Carbone y Lux., 1984). Presentan un bajo umbral de activación (-50 a -30 mV), permeabilidad similar para Ca^{2+} y Ba^{2+} y una rápida inactivación. Es insensible a dihidropiridinas y es más sensible al bloqueo por Ni^{2+} que por Cd^{2+} . Esta formado por las subunidades α_{1G} (cerebro, sistema nervioso periférico y medula adrenal),

α_{1H} (cerebro y corazón) y α_{1I} (cerebro) según el tejido (Gandía y col., 1995; García y col., 2006).

Canales de alto umbral de activación:

Dentro de este grupo se han identificado cuatro subgrupos en función de la isoforma de subunidad α que los constituye y de sus características farmacológicas. Los subtipos de CCVD son L, N, P/Q y R;

- **Subtipo L:** Este subtipo de canal parece estar presente en todos los tipos de células excitables. En cada tejido se expresa una isoforma distinta de la subunidad α . Así, la subunidad α_{1S} constituye los canales L en el músculo esquelético, la α_{1C} en el corazón, musculatura lisa y cerebro, la α_{1D} en el cerebro y la medula adrenal y la α_{1F} en la retina (García y col., 2006). El CCVD del subtipo L se caracteriza por presentar una lenta inactivación. Su conductancia unitaria es de 18 a 25 pS. Farmacológicamente se caracterizan por presentar sensibilidad a dihidropiridinas, ya sean agonistas como el Bay K 8644 como antagonistas por ejemplo el nimodipino o el nifedipino. Las dihidropiridinas agonistas prolongan el tiempo de apertura del canal.
- **Subtipo N:** Está formado por la subunidad α_{1B} . Presenta también una lenta inactivación, pero mas rápida que la que presentan los canales del subtipo L. Su conductancia unitaria es menor que la de los canales L (13 pS) y son insensibles a dihidropiridinas. Se bloquean de forma irreversible por la ω -conotoxina GVIA (Gandía y col., 1995; García y col., 2006) y de forma reversible por la ω -conotoxina MVIIA.
- **Subtipo P/Q:** Los canales P y Q son dos canales que están formados por la subunidad α_{1A} , pero la dificultad de separar sus corrientes hace que en la literatura se hable de componente P/Q de la corriente. No hay toxinas que permitan disecar las corrientes P y Q por separado. Este componente se inactiva por voltaje, por la ω -conotoxina MVIIC y la ω -conotoxina GVIA entre otras.

- Subtipo R: Son los responsables de una corriente residual en tejidos neuronales en condiciones de bloqueo de los demás componentes de la corriente. Son insensibles a dihidropiridinas y toxinas. La corriente R se inactiva rápidamente y es más sensible al bloqueo por Ni^{2+} que por Cd^{2+}

En el caso de la médula adrenal, origen de la línea celular PC12, la distribución de los tipos de canales es distinta en función de la especie. Por ejemplo, los gatos expresan principalmente los subtipos L y N, casi la 50% cada uno, en las células de la medula adrenal, mientras que en la médula adrenal humana se expresa mayoritariamente el canal P/Q y en cantidades similares el canal L y N. Ratón y rata expresan los cuatro subtipos de canales de alto umbral de activación en sus células cromafines (García y col., 2006).

2.1.1.2 Mecanismos de extrusión de Ca^{2+}

Para disipar los aumentos de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, la célula también dispone de diversos mecanismos. Estos mecanismos no implican solo a proteínas, sino también dos orgánulos como son el retículo endoplásmico y la mitocondria (**Figura 2**).

En el citosol, la célula dispone de proteínas secuestradoras de Ca^{2+} como la calbindina -D28K y la parvalbúmina (Berridge y col., 2003). Pero además, en el disipado de los aumentos de Ca^{2+} citosólico participan dos orgánulos con un importante papel en este aclaramiento, el retículo endoplásmico y la mitocondria; y proteínas de la membrana plasmática como la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ de la membrana plasmática (Guerini y col., 2005).

En el retículo endoplasmico se encuentra la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana del retículo endoplásmico (SERCA, del ingles **Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase**). Esta bomba transporta Ca^{2+} al lumen del retículo con gasto de energía. Una vez en el lumen reticular, el Ca^{2+} es secuestrado por proteínas secuestradoras de Ca^{2+} como la calreticulina, la calsecuestrina y proteínas de

estrés reticular como GRP78 y GRP94 (Berridge y col., 2003). La concentración de Ca^{2+} reticular ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$) en reposo puede alcanzar valores del orden de 1 mM.

La mitocondria es un orgánulo de vital importancia para la supervivencia celular, debido a su implicación en la producción de la energía de la célula, en forma de ATP. Es un orgánulo de doble membrana que a su vez encierran dos espacios diferenciados, que son la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. Las dos membranas poseen distintas características en lo que a permeabilidad se refiere. La membrana mitocondrial externa es rica en una proteína transportadora llamada porina, que permite el paso de sustancias de hasta 5 KDa incluyendo pequeñas proteínas (Alberts y col., 4ª edición), mientras que en la membrana interna de la mitocondria se sitúan gran cantidad de proteínas transportadoras específicas, que permiten el paso de sustancias diversas a su través dada la alta impermeabilidad a sustancias que presenta esta membrana, y las proteínas de la cadena respiratoria.

Debido a la presencia de la maquinaria productora de la energía celular, tradicionalmente se la consideró la "fábrica" de la energía hasta que se demostró que era capaz de captar Ca^{2+} y que esta captación era dependiente del transporte electrónico (Vasington FD, 1963). En la mitocondria, el principal mecanismo de entrada para el Ca^{2+} es el conocido como uniportador de Ca^{2+} . En la cadena de transporte electrónico se produce un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, lo que genera potencial de membrana de -180 mV, que es utilizado como fuerza motriz por el uniportador para transportar Ca^{2+} a favor de gradiente (Álvarez y col., 1999). Es un transportador de baja afinidad, con una K_m de 43 μM (Montero y col., 2000) que se bloquea por rojo rutenio. Los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Alvarez y col., 1999) colaboran al aclaramiento del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ que tiene lugar cuando se activa el uniportador mitocondrial. El intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ es electroneutro, puesto que saca un ión Ca^{2+} por cada dos H^+ que introduce a la matriz, por tanto no contribuye al mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial, mientras que el $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ si es electrogénico, puesto que introduce 3 iones Na^+ por cada ión Ca^{2+} que saca de la matriz.

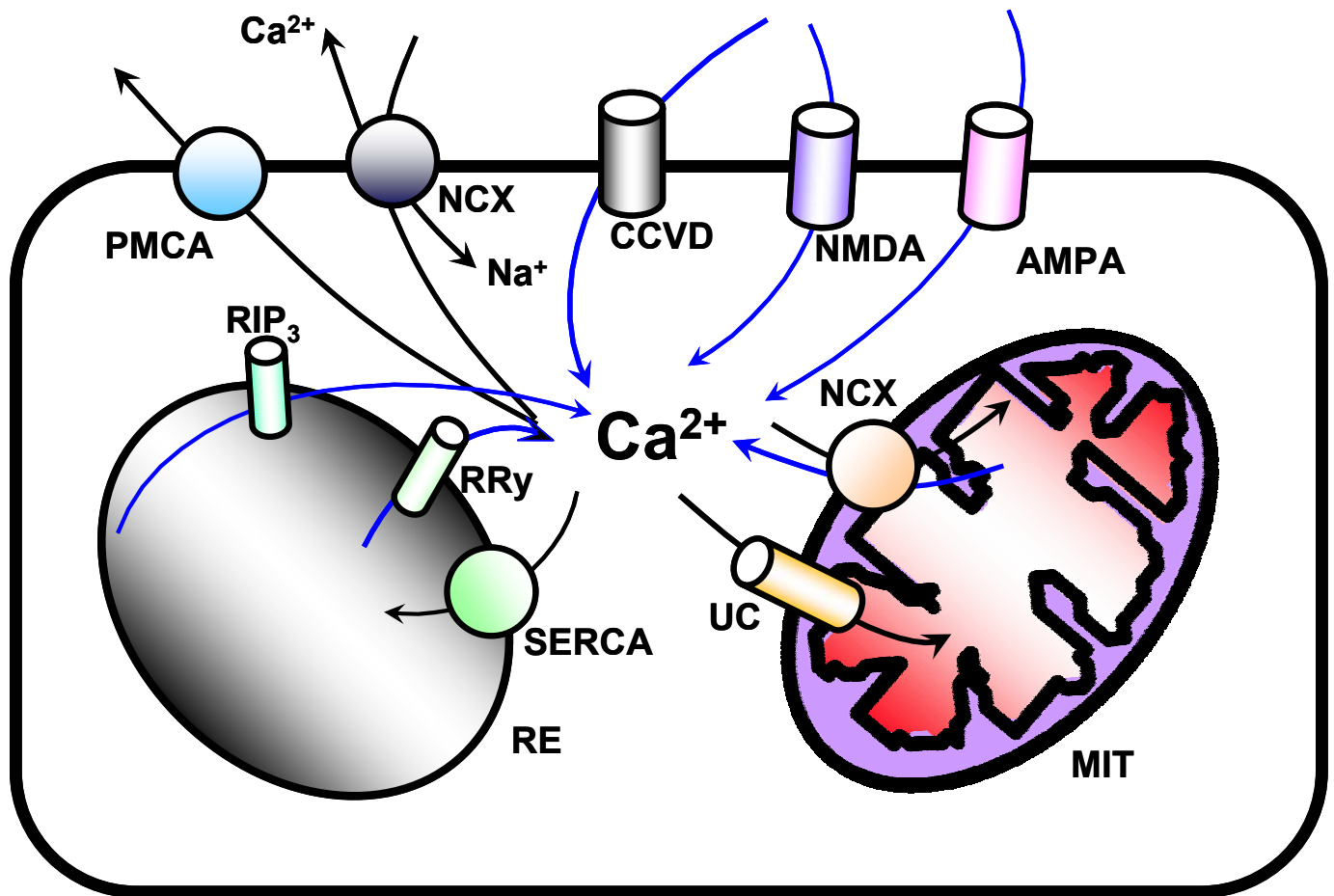


Figura 2: Representación esquemática de los mecanismos de introducción (flechas azules) y extrusión de Ca^{2+} (flechas negras) de que disponen las células. PMCA= Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, NCX= intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$, UC= uniportador mitocondrial de Ca^{2+} , CCVD= canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, NMDA= receptor de tipo NMDA, AMPA= receptor de tipo AMPA, RIP₃= receptor de IP₃, RRy= receptor de rianodina, SERCA= Ca^{2+} -ATPasa de la membrana del retículo endoplásmico, RE= retículo endoplásmico, MIT= mitocondria.

2.2 El Ca^{2+} en la muerte celular

Existen evidencias en la literatura de la implicación de este ión en la muerte celular. Así pues, Mclean y col. (1965) observaron en hígados dañados por toxinas una acumulación de Ca^{2+} y sugirieron que este Ca^{2+} acumulado era la causa del daño en el tejido. Zimmerman y col. (1966) encontraron que la perfusión con soluciones que contenían Ca^{2+} de corazones aislados llevaba a una pérdida de la capacidad contráctil seguida de una muerte masiva. Más adelante Schanne y col. demostraron, ya en cultivos de células hepáticas, que

determinadas toxinas provocaban la muerte celular sólo cuando las células eran expuestas a ellas en presencia de Ca^{2+} (Schanne y col., 1979). También existen evidencias que desde muy pronto relacionaron la sobrecarga de Ca^{2+} con el daño neuronal (Schlaepfer y Bunge., 1973; Choi DW., 1985; Garthwaite y col., 1986). En el marco del sistema nervioso, existen evidencias de la implicación del Ca^{2+} en los daños causados a las neuronas por el ictus y en el desarrollo de la epilepsia (Roda y col., 1995; Sobrado y col., 2003; DeLorenzo y col., 2005)

2.2.1 El Ca^{2+} , la mitocondria y la apoptosis.

El termino apoptosis fue acuñado por Kerr y col. (1972) para definir lo que hasta entonces se conocía como muerte celular programada. Es un proceso de gran importancia durante el desarrollo. Los organismos multicelulares eliminan células sobrantes, dañadas o infectadas por este mecanismo. Es un proceso esencial en el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, el mantenimiento de la homeostasia de los tejidos, la eliminación de células dañadas o la generación de la memoria inmune del organismo. Pero también, si se pierde su control puede convertirse en un proceso patológico que causa efectos tan heterogéneos como la neurodegeneración, el desarrollo de enfermedades autoinmunes o enfermedades tan devastadoras como el cáncer (Cory y Adams, 2002). La célula dispone de una compleja maquinaria para el desarrollo de este "suicidio programado" en el que participan orgánulos y proteínas específicas. Entre otros, se implican en este proceso la mitocondria, las proteasas aspartato-específicas, cisteína-dependientes, conocidas como caspasas, efectoras de la muerte celular, y las proteínas de la familia Bcl2, reguladoras del avance o retroceso del proceso.

La muerte celular por apoptosis presenta un patrón morfológico muy definido. Dos características principales definen este proceso: uno es la formación de los llamados "cuerpos apoptóticos", que contienen orgánulos, partes del citosol y cromatina fragmentada; el otro es la condensación de la cromatina y su fragmentación ordenada en oligonucleosomas (Thompson y Edinger., 2004; Golstein y Kroemer., 2006). Este proceso no provoca una liberación del

contenido celular al espacio extracelular y por tanto no va acompañado de una reacción inflamatoria.

2.2.1.1 Mecanismos moleculares de la apoptosis

Existen dos mecanismos para la activación de la cascada de caspasas, efectora de la muerte celular. Una es dependiente de receptores de membrana (vía extrínseca) mientras que la otra es dependiente de la mitocondria (vía intrínseca).

La vía mitocondrial o intrínseca de activación de caspasas cursa con una liberación de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria. Cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) y se satura la capacidad transportadora de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, se abre el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) y se produce el consiguiente colapso del potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Schinder y col., 1996; Tornero y col., 2000). Esto conlleva la liberación de proteínas de la matriz mitocondrial como el citocromo c y Smac/Omi (Cory y Adams., 2002). El citocromo c se une a Apaf1 (del inglés apoptotic protease-activating factor 1) y a ellos se une la caspasa 9, que es proteolizada a su forma activa y que a su vez activa la procaspasa 3 a su forma activa (**Figura 3**)

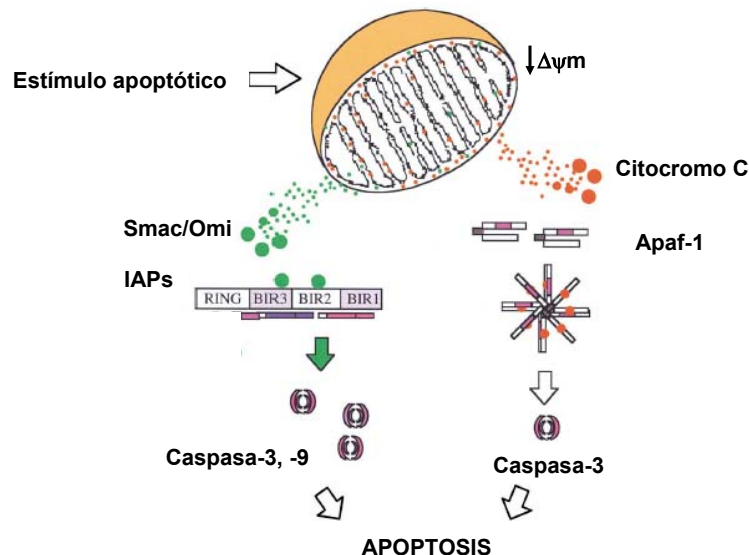


Figura 3: Esquema de la vía de apoptosis celular en la que la mitocondria participa como centro integrador de señales. Apaf-1: factor activador de las proteasas apoptogénicas; $\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial, Smac/Omi: activador mitocondrial de caspasas secundario; IAPS: Inhibidores de caspasas. Adaptado de Zimmermann y col., 2001.

En el sistema nervioso, los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ son la base de la comunicación entre neuronas y de éstas con sus órganos efectores a través de los potenciales de acción. En una situación fisiológica, el aumento repentino de la $[Ca^{2+}]_c$ es captado y redistribuido por la mitocondria (Villalobos y col., 2000; Montero y col., 2000) para evitar una sobrecarga de Ca^{2+} . Sin embargo, cuando la capacidad de la mitocondria de tamponar los incrementos de Ca^{2+} se ve superada, se desencadena la apoptosis y es entonces cuando la mitocondria se convierte en una fuente de señales de muerte celular.

La liberación de proteínas del espacio intermembrana que tiene lugar tras la apertura del poro de permeabilidad de transición mitocondrial (PPTM) es un proceso mediado por la proteína pro-apoptótica Bax (Jürszenmeier y col., 1998; Narita y col., 1998). Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl2 inhiben la apoptosis en este nivel (Kim y col., 1997; Finucane y col., 1999). Sin embargo, el mecanismo por el cual la proteína Bcl2 realiza esta función anti-apoptótica permanece aún sin ser dilucidado, si bien parece que podría estar basado en la capacidad de los miembros de la familia Bcl2 de interaccionar entre ellos.

2.3 La familia Bcl2

El nematodo *Caenorhabditis elegans* constituyó el modelo perfecto para el estudio de la regulación de la apoptosis, dado que durante su desarrollo se producen exactamente 131 procesos de muerte programada (Ellis y col., 1991). Un estudio de la maquinaria implicada en este sencillo organismo llevó a la identificación de tres locus genéticos, ced-3, ced-4 y ced-9, los dos primeros esenciales para la muerte de las células durante el desarrollo del gusano y el tercero que podía prevenir la acción de los otros dos. En mamíferos, surgió la primera evidencia de la existencia de un factor promotor de la supervivencia celular con la observación de que el proto-oncogen bcl2 (del inglés B cell lymphoma 2) permitió la supervivencia de células hematopoyéticas dependientes de citoquinas en ausencia de dichas citoquinas (Vaux y col., 1988). El mismo

grupo de investigación demostró poco después que CED-9 y Bcl2 eran homólogos estructurales y funcionales (Vaux y col., 1992).

Actualmente se han identificado en mamíferos 19 miembros de la familia, aparte de Bcl2. También hay miembros identificados en otros organismos de tan distintos orígenes como el pollo, la mosca *Drosophila melanogaster*, algunos virus o esponjas marinas, entre otros.

2.4 Estructura de Bcl2 y otros miembros de la familia

La característica común que presentan los miembros de esta familia es la presencia de unos dominios estructurales de homología con Bcl2 o BH (del inglés Bcl2 Homology).

Las proteínas de esta familia se agrupan en dos subfamilias en función de su efecto de prevención o promotor de la muerte celular:

- Miembros anti-apoptóticos
- Miembros pro-apoptóticos

Los miembros anti-apoptóticos de la familia (Bcl2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-W) así como el homólogo de *Caenorhabditis elegans* CED-9 presentan los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 y además, un dominio transmembrana en el extremo carboxilo terminal que les permite anclarse a las membranas celulares (Reed, JC., 2000).

Los miembros pro-apoptóticos se clasifican a su vez en dos subgrupos: La familia multidominio, que incluye a miembros como Bax, Bak, y Bcl-X_s que presentan los dominios BH1, BH2 y BH3; y la familia monodominio BH3, que incluye a Bid, Bad y Bim entre otros que solo presentan, tal como indica el nombre de la familia, el dominio BH3. Algunos presentan también un dominio transmembrana que les permite anclarse a las membranas (Cory y Adams., 2002; Zimmerman y col., 2001) (**Figura 4**).

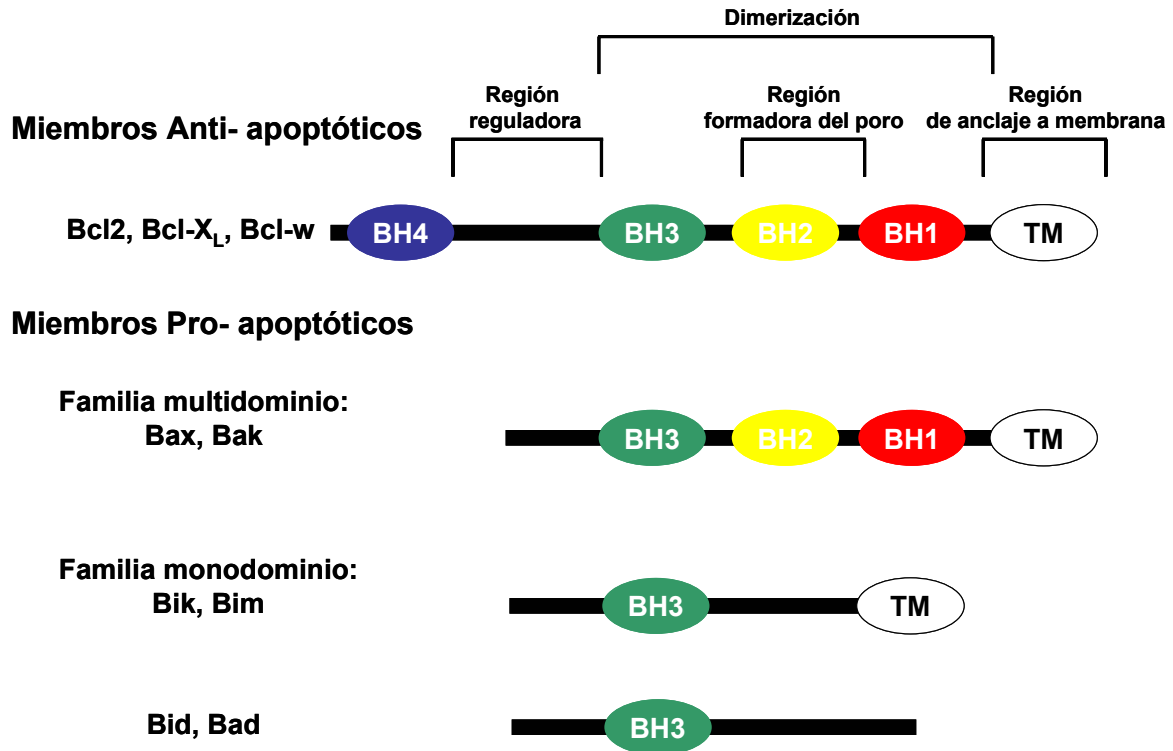


Figura 4: Representación esquemática de la estructura de los miembros de la familia Bcl2. Adaptado de Zimmermann y col., 2001. BH= homología con Bcl2, TM= dominio de anclaje a membrana

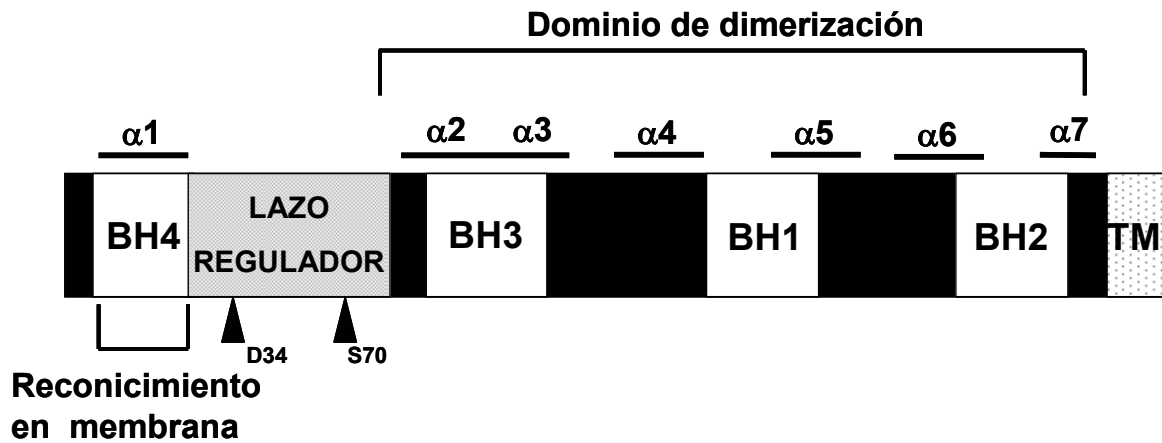


Figura 5: Estructura pormenorizada de Bcl2 en la que se muestran las distintas α-hélices que la componen, los dominios reguladores y las estructuras de anclaje a la membrana

Bcl2 es una proteína integral de membrana, que se encuentra anclada a las membranas en el lado citosólico a través de su extremo carboxilo terminal hidrofóbico (Cory y Adams, 2002). Posee una estructura globular en la que 5 α -hélices anfipáticas rodean a dos α -hélices hidrofóbicas que están en el centro de la estructura (**Figura 5**).

2.5 Bcl2 como formador de canales

Los miembros de la familia Bcl2 pueden formar dímeros (Oltvai y col., 1993; Sedlak y col., 1995; Sato y col., 1994) que aumentan la resistencia de las células a la muerte por apoptosis o promueven esta muerte celular. La naturaleza de estos dímeros depende de la abundancia relativa de miembros pro y anti-apoptóticos, de forma que una mayor abundancia de proteínas promotoras de la muerte celular daría lugar a dímeros que decantarían el equilibrio muerte-supervivencia hacia el lado de la muerte, mientras que una mayor proporción de proteínas anti-apoptóticas generaría dímeros que decantarían el proceso hacia la supervivencia celular (Figura 6, panel A). La homodimerización de los miembros pro-apoptóticos de la familia se ha demostrado que requiere sólo de la presencia del dominio BH3, así como para la heterodimerización Bax-Bcl2. Sin embargo, para la homodimerización Bcl2-Bcl2 se necesitan los 4 dominios BH (**Figura 6**, panel B). Además, la liberación de las proteínas mitocondriales está mediada por Bax y Bak. Bcl2 actuaría inhibiendo la función pro-apoptótica de estas proteínas, probablemente secuestrando proteínas antiapoptóticas a través de sus dominios BH3 (Cheng y col., 2001). De hecho, entre los dominios BH1, BH2 y BH3 se forma un surco hidrofóbico que es capaz de unir la α -hélice del dominio BH3 de otra proteína de la familia (Cory y Adams, 2002).

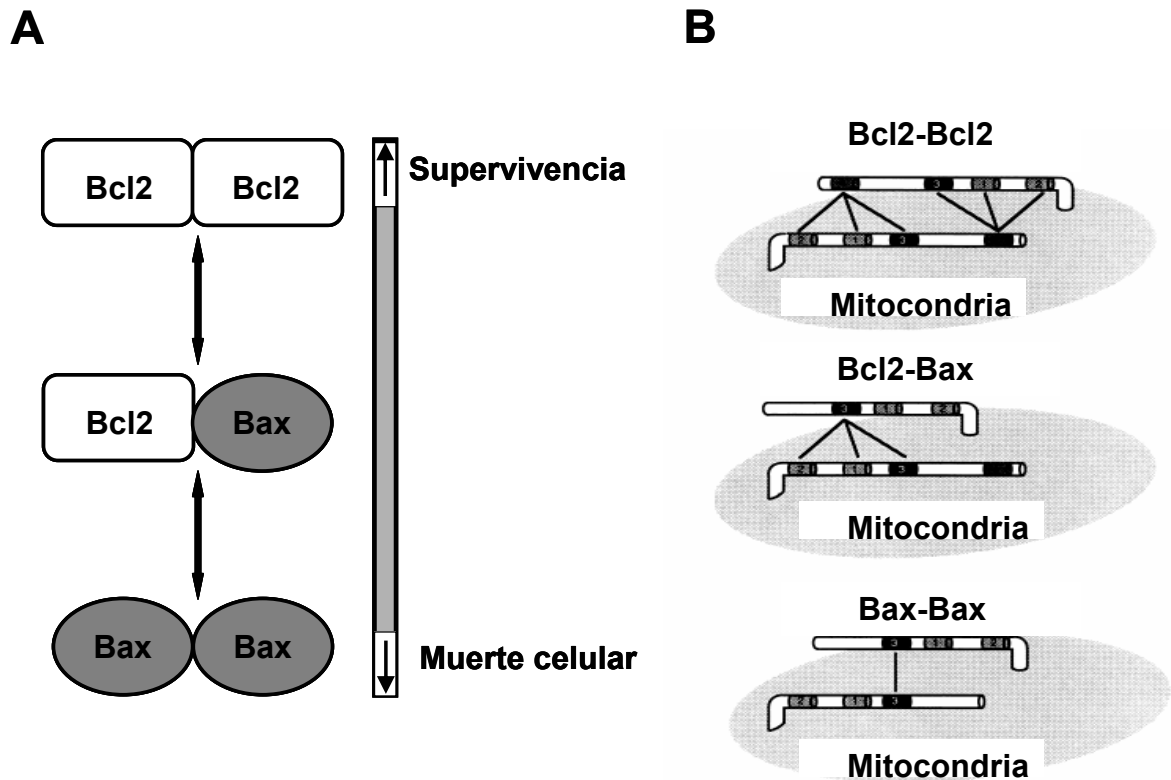


Figura 6: Panel A: Esquema en el que se ilustran los dos posibles destinos de la célula y cómo la proporción de proteínas pro y anti-apoptóticas puede decantar el equilibrio a un lado u otro. Panel B: Esquematización de las interacciones entre Bcl2 y Bax en la formación de homodímeros y heterodímeros (Adaptado de Meijerink., 1997)

La estructura tridimensional de Bcl-X_L, homólogo de Bcl2, demostró la similitud que las proteínas de esta familia presentaban con los dominios formadores de poros de la toxina diftérica y de las colicinas bacterianas (Muchmore y col., 1996). Estas toxinas son capaces de formar canales en tres pasos:

- Asociación con la membrana y una orientación que permita la posterior inserción
- Inserción de las dos α -hélices hidrofóbicas perpendicularmente al plano de la membrana, lo que deja al resto de los dominios de la proteína en una conformación abierta, como si de un paraguas se tratara.
- Formación del canal por oligomerización de dos o más proteínas de la familia en la membrana, cada una contribuyendo con dos hélices, o bien por la inserción de hélices anfipáticas para formar un canal

monomérico (Cleveland y col., 1983; Cramer y col., 1992, 1995; Donovan y col., 1981).

Estudios realizados con proteínas de la familia Bcl2 han demostrado que estas proteínas, en membranas lipídicas planas, son capaces de formar canales conductores de iones (Schendel y col., 1997; Minn y col., 1997). Bcl2, en membranas lipídicas, forma canales de dos conductancias, correspondientes con poros formados por dos y tres subunidades de la proteína. Esta formación de canales es dependiente de pH. También la selectividad iónica de los canales de Bcl2 se ve afectada por el pH, siendo el canal selectivo para cationes monovalentes por encima de pH= 5 (Schendel y col., 1997). Las proteínas proapoptóticas, como Bax, también forman canales de una manera pH-dependiente. La diferencia reside en que Bcl2 presenta una cierta selectividad por cationes (K^+ antes que Cl^-) al aumentar el pH mientras que en estas mismas condiciones Bax muestra una insistente selectividad por aniones (Cl^-). Esta selectividad se puede deber a la diferencia de cargas en la región formadora del poro, donde Bcl2 tiene aminoácidos cargados negativamente mientras que Bax los tiene cargados positivamente (Schlesinger y col., 1997).

2.6 Influencia de Bcl2 sobre la homeostasia del Ca^{2+}

La influencia de Bcl2 sobre la homeostasia del Ca^{2+} es un hecho ampliamente demostrado en la bibliografía. Muchos de los trabajos atribuyen el efecto antiapoptótico de Bcl2 a su capacidad de afectar a la magnitud de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y de regular la intensidad de los tránsitos de Ca^{2+} intracelulares.

En esta línea y en cuanto a lo que se refiere al Ca^{2+} del retículo endoplásmico, existe controversia en cuanto al efecto que Bcl2 realiza sobre la magnitud de estos depósitos (Distelhorst y col., 2004). Hay una mayoría de trabajos realizados con el objetivo de analizar este efecto que muestran una no influencia

o incluso un aumento de la magnitud de los depósitos de Ca^{2+} del retículo (Zhong y col., 1993; Lam y col., 1994, Distelhorst y col., 1996) y una minoría que observa una menor cantidad de Ca^{2+} en el retículo cuando se sobreexpresa la proteína Bcl2. Y, a pesar de ser minoría, estos trabajos son de mayor peso científico que aquellos en los que se observaba un efecto nulo de Bcl2. En estos artículos se realizan medidas directas del Ca^{2+} reticular con sondas genéticamente codificadas como el "cameleon" (Palmer y col., 2004) o la ecurina reticular (RE-AEQ) (Pinton y col., 2000) adaptadas para la determinación de Ca^{2+} en entornos de alta concentración. Otros trabajos realizados para comprender la influencia de Bcl2 sobre la homeostasia del Ca^{2+} demuestran que esta influencia no se restringía al Ca^{2+} reticular.

En células HeLa y utilizando las ecurinas quiméricas correspondientes, Pinton y col. demuestran que la sobreexpresión de Bcl2 disminuye los niveles de Ca^{2+} en el citosol, la mitocondria, el retículo y el aparato de Golgi (Pinton y col., 2000) En otro modelo celular como es la línea WEHI7.2 (linfocitos T) (Chen y col., 2004) se encuentra que tanto el Ca^{2+} citosólico como la extensión de la liberación del Ca^{2+} del retículo estaban disminuidas en la situación de sobreexpresión de Bcl2 con respecto a su control

En un modelo de adenocarcinoma (Padar y col., 2004) del que existe un clon resistente a taxol, que sobreexpresa Bcl2, se demuestra que también los tránsitos citosólicos de Ca^{2+} se encuentran disminuidos en las células que sobreexpresaban Bcl2 con respecto a su control. En otro modelo de distrofia muscular de Duchenne encontramos que la sobreexpresión de Bcl2 provoca una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_{pm}$ (zona del subplasmalema) (Basset y col., 2006)

Pese al amplio espectro de tipos celulares en los que se ha estudiado la influencia de Bcl2 sobre el Ca^{2+} intracelular, se sabe poco acerca de los efectos que Bcl2 podría realizar en células excitables. Es decir, la posible interacción CCVD y Bcl2.

En 1999, el grupo de investigación de Hugo Geerts y Marcel Borgers desarrolló unos clones de la línea PC12 que sobrexpresaban Bcl2 (Dispersyn y col., 1999). La línea PC12 expresa en su membrana los canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente del subtipo L (68 %) y N (32 %) (Usowicz y col., 1990).

Se ha demostrado que la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} debido a la entrada de dicho ión a través del canal de Ca^{2+} del subtipo L provoca la muerte celular en células cromafines bovinas (Cano-Abad y col., 2001), lo que convierte a los clones de PC12 generados por los doctores Geerts y Borgers en una interesante herramienta para intentar dilucidar cómo Bcl2 protege a las células frente a la sobrecarga de Ca^{2+} .

2.7 Bcl2 en la epilepsia

Según el entorno patológico en que la enmarquemos, la proteína Bcl2 puede ser una amiga bienvenida o una presencia indeseable. En el marco de la leucemia mieloide aguda y el cáncer de próstata, Bcl2 se ha mostrado como un factor pronóstico negativo (Sentman y col., 1991). En enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, la presencia de Bcl2 puede significar una mayor supervivencia de las neuronas adultas y por tanto, un menor progreso de la enfermedad.

Uno de los trastornos neurológicos más comunes, junto con el daño traumático cerebral y el ictus, es la epilepsia. Afecta aproximadamente al 1-2% de la población mundial. Dentro de esta población, un 20-30% de los pacientes son resistentes a la medicación antiepiléptica. La opción terapéutica para estos pacientes es la extirpación quirúrgica del foco epileptógeno, que si bien se relaciona con una evolución positiva del paciente (Bonilha y col., 2007) es una intervención que implica un alto riesgo.

La epilepsia es, según la OMS, una afección crónica producida por diferentes etiologías, caracterizada por la repetición de crisis debidas a una descarga

excesiva de las neuronas cerebrales. Una crisis epiléptica es la manifestación comportamental y sintomática de un disparo espontáneo, sincronizado y de alta frecuencia de poblaciones de neuronas del sistema nervioso central (Lothman y col., 1991; McNamara, 1994, 1999). Aunque las epilepsias se clasifican en diversos tipos en función de los síntomas que presentan (Frazen, 2000) y pueden presentarse en diversas formas, el factor común que presentan todos los tipos de epilepsia es la hiperexcitabilidad neuronal que se manifiesta con distintas frecuencias en la generación de una crisis epiléptica (Lothman y col., 1991; McNamara, 1994, 1999). Más de un 50 % de los casos de epilepsia se asocian con un daño neurológico previo y se clasifican bajo el epígrafe de epilepsia adquirida. El resto de los casos no se asocian con ninguna anomalía cerebral y se clasifican como epilepsia idiopática (DeLorenzo, 1989, 1991).

La mayoría de las epilepsias adquiridas están originadas por tres causas principales: status epilepticus (SE, 40% de los casos), ictus (25 % de los casos) y daño traumático cerebral (TBI, del inglés traumatic brain injury, 13 % de los casos). El factor común de estas tres causas es un aumento de la concentración extracelular de glutamato (DeLorenzo y col., 2005). Esta circunstancia se ha asociado con muerte neuronal a través de una sobreexcitación de los receptores de glutamato de tipo NMDA, concomitante con un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ que termina con el desencadenamiento de la muerte celular (Choi DW., 1988).

La hipótesis del Ca^{2+} como causante de la epileptogénesis (DeLorenzo y col., 2005) postula que los cambios de la $[Ca^{2+}]_c$ asociados a la hiperexcitabilidad por glutamato están en la base de este proceso. Los cambios de la $[Ca^{2+}]_c$ oscilan entre aumentos controlados en la intensidad y el tiempo que llevan a la correcta función neuronal y cambios descontrolados e intensos que desencadenan los procesos de muerte. Entre estos dos extremos hay incrementos de Ca^{2+} prolongados, que no son suficientemente intensos para causar la muerte y que dan lugar al desarrollo de cambios patológicos en el patrón de expresión de proteínas. La hipótesis del Ca^{2+} en la epileptogénesis dice que las neuronas que sobreviven a estos incrementos subletales de la $[Ca^{2+}]_c$ son los que sufren estos cambios que llevan a la epilepsia.

Uno de los cambios que se puede observar en modelos tanto de TBI como de epilepsia es un incremento en la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl2 y Bcl-X_L. En ratas sometidas a un daño traumático, Clark y col. (1997) encontraron un aumento de la expresión tanto de la proteína como del mRNA de Bcl2. En este estudio, el máximo de proteína se mantuvo estable hasta las 168 h desde el daño traumático en la corteza y alcanzó un máximo a las 24-72 horas en el hipocampo. En un modelo de epilepsia en rata se demostró (Schindler y col., 2004) que la proteína Bcl2 no aparecía variada en la fracción mitocondrial, pero aparecía en la fracción citosólica del lado ipsilateral a la lesión, al mismo tiempo que proteína de la familia de Bcl2 como Bcl-w si se veía aumentada tras la crisis epiléptica.

Sin embargo, los resultados más interesantes en cuanto a la expresión de Bcl2 en el marco de la epilepsia se encontraron en estudios hechos en tejido humano. En concreto, Clark y col (1999) encontraron un aumento de Bcl2 y Bcl-X_L en tejido cerebral de pacientes de TBI, si bien la segunda se expresa constitutivamente en tejido de pacientes control. Minami y col (2000) encontraron que en muestras de cirugía de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, la más común de las epilepsias y que presenta mayor resistencia a fármacos (Henshall y Simon., 2005) las proteínas Bcl2 y Bcl-X_L se encontraban significativamente aumentadas con respecto a las muestras control (Minami y col.,2000).

3. Justificación y Objetivos

En los países desarrollados los principales problemas de salud se asocian con el sistema nervioso. Enfermedades tan incapacitantes como el Alzheimer, el ictus o la epilepsia son cada vez más comunes en la sociedad.

Estas patologías aparentemente tan distintas tienen un factor común, que es la pérdida de neuronas causada por sobrecargas de Ca^{2+} . Existe evidencia de que la sobrecarga de Ca^{2+} lleva a la muerte celular (Cano-Abad y col., 2001) y de que la proteína Bcl2 protege frente a esta muerte celular (Arias y col., 2004; Dispersyn y col., 1999; Nuydens y col., 2000a, 2000b), probablemente a través de la regulación de los tránsitos de Ca^{2+} . Es, por tanto, interesante conocer el mecanismo por el cual Bcl2 protege a las células, para la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas que puedan mimetizar sus efectos protectores y proteger las neuronas de la muerte celular en el marco de estas patologías.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido profundizar en el mecanismo de acción de la proteína Bcl2 en células PC12. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Papel de Bcl2 en la regulación del Ca^{2+} citosólico y mitocondrial.
2. Determinar cómo Bcl2 regula la entrada de Ca^{2+} a través de los CCVD en células PC12
3. Determinar la influencia de Bcl2 sobre las corrientes de Ca^{2+} y el potencial de membrana
4. Determinar la expresión de Bcl2 en muestras quirúrgicas de tejido control, corteza e hipocampo de pacientes epilépticos resistentes a la medicación antiepiléptica sometidos a cirugía.

4. Materiales y Métodos

4.1 Células PC12

4.1.1 Características del modelo celular

Los experimentos que aparecen reflejados en esta memoria los hemos realizado en células de feocromocitoma de rata denominadas PC12. En concreto hemos utilizado dos clones establemente transfectados con un plásmido que contiene el cADN que codifica para la proteína Bcl2, clon llamado cl-7 PC12 al que llamaremos de ahora en adelante Bcl2, o con dicho plásmido vacío como control, clon llamado pCDA PC12 al que nos referiremos como Control. Dichos clones fueron amablemente cedidos por el Dr. Hugo Geerts y el Dr. Marcel Borgers del Departamento de Fisiología Celular de “Janssen Research Foundation” en Beerse, Bélgica (Dispersyn y col., 1999). También se ha utilizado una línea celular de PC12 sin manipulación genética que, en adelante, denominaremos con el acrónimo NMG (No Modificadas Genéticamente).

La línea celular PC12 fue establecida por Greene y Tischler en 1976 desde un tumor sólido extraído a ratas en el New England Deaconess Hospital (Greene y col., 1976).

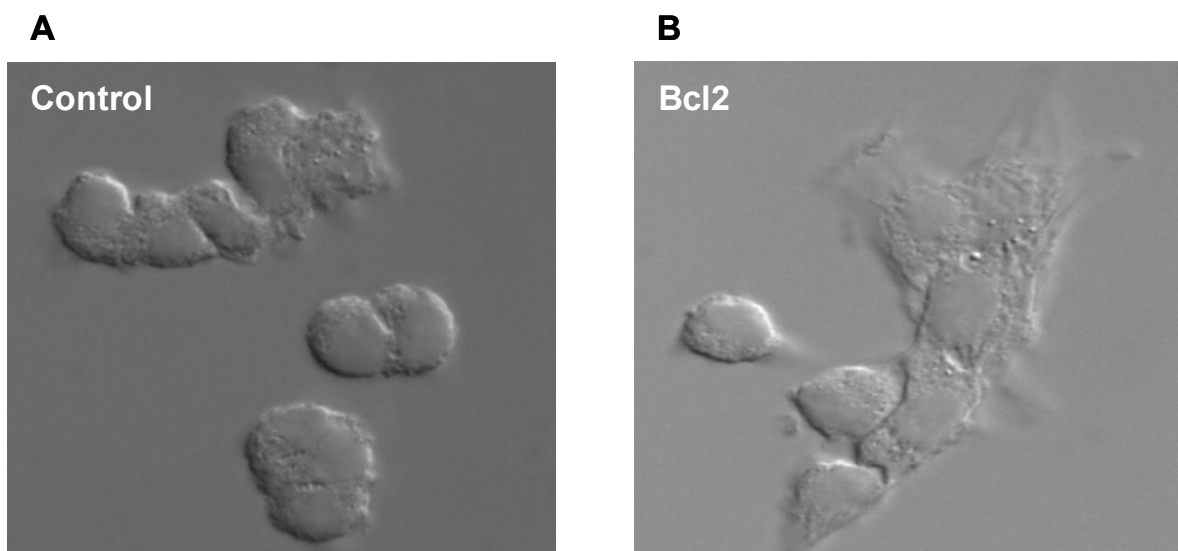


Figura 7: Microfotografías obtenidas por microscopia de contraste de fases de células Control (A) y Bcl2 (B). Observamos una morfología típica poligonal, tanto en Control como en Bcl2. Se puede apreciar también que los clones no pierden el fenotipo de la línea PC12

Las células de esta línea presentan una morfología poligonal y tienden a crecer formando acúmulos.

Al ser tratadas con NGF emiten neuritas similares a aquellas que emiten las neuronas simpáticas en cultivos primarios, pero al contrario de éstas, no necesitan de la continua presencia de este factor en el medio para sobrevivir. Este tipo de respuesta al factor de crecimiento neural sugiere que la línea PC12 posee un origen en células madre de la cresta neural común con las neuronas simpáticas, pero la independencia del NGF para su supervivencia indica que las PC12 poseen aún la pluripotencia de una célula progenitora que puede diferenciarse hacia célula cromafín o neurona simpática. La presencia de NGF promovería la diferenciación hacia el fenotipo neuronal.

Las células PC12 sintetizan y almacenan catecolaminas como la dopamina y noradrenalina, pero no adrenalina, lo que recuerda al fenotipo de las células cromafines noradrenérgicas y las neuronas simpáticas. Al contrario que estos modelos celulares, las células PC12 contienen más dopamina que noradrenalina (Greene y col., 1976).

Diversos trabajos con este modelo celular han demostrado que se observan cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ en respuesta a cafeína, lo que evidencia la presencia de receptores de rianodina (RRy) (Cataldi y col., 2005; Moreno y col., 2005; Tully y col., 2004). También responden a bradiquinina lo que indica la presencia de receptores de IP_3 (RIP₃) (Fasolato y col., 1991; Pizzo y col., 1997; Cataldi y col., 2005). Tanto los estudios de inmunodetección como de respuesta a agonistas demuestran la expresión en células PC12 de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\alpha 4$ del receptor nicotínico (Skok y col., 1999; Li y col., 1999; Taylor y col., 2000; Chen y col., 2003; Ren y col., 2005). Además, las células PC12 expresan en su membrana plasmática canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes del subtipo L (68 %) y N (32 %) (Urowicz y col., 1990). Esto nos proporciona gran cantidad de vías de manipulación del Ca^{2+} intracelular para poder estudiar los efectos de Bcl2 sobre su homeostasia.

4.1.2 Mantenimiento del cultivo celular

Las células Control y Bcl2 se mantuvieron en cultivo en monocapa en una botella de 75 cm² (Iwaki). El medio de cultivo utilizado fue DMEM con alta concentración de glucosa (4500mg/l) enriquecido con 7,5% de Suero Bovino Fetal (SBF), 7,5% de Suero de Caballo (SC), 2 mM de L-Glutamina, 25 U/ml de penicilina y 25 µg/ml de streptomicina (Todos de GIBCO-Invitrogen). Se empleó la Geneticina (G418, 200 µg/ml) como antibiótico de selección para el mantenimiento de la estabilidad del clon. Las células PC12 sin manipulación genética se mantuvieron en cultivo en condiciones similares a los clones pero sin L-Glutamina ni antibiótico de selección. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera de aire (95%) y CO₂ (5%) saturada de humedad.

El medio de cultivo se cambió cada dos días por medio fresco y cuando las células alcanzaban una confluencia del 70-80% se levantaban de la botella con Tripsina-EDTA para realizar una dilución del número total de células en varias botellas de cultivo.

4.2 Determinación de los cambios de la $[Ca^{2+}]_c$ y la $[Ca^{2+}]_m$ con la proteína bioluminiscente ecuorina.

4.2.1 Fundamento

La ecuorina (AEQ) es una proteína bioluminiscente, originalmente aislada de la medusa *Aequoria Victoria* y que se ha utilizado históricamente como sensor de Ca^{2+} , dado que la emisión de luz es dependiente de este ión. A pesar de lo laborioso de su extracción desde la medusa (que ha de ser muy cuidadosa para evitar el contacto con el Ca^{2+}), durante 30 años fue utilizada como sensor de Ca^{2+} , con una limitación, que sólo podía ser usada en células grandes, puesto que había de ser microinyectada (Rudolf y col., 2003). Debido a estas limitaciones fue desbancada de su puesto por las sondas sintéticas de Ca^{2+} como sensor hasta que, en 1985, Inouye y col. clonaron el cADN de la AEQ. La

posibilidad de la expresión recombinante de la AEQ amplió el número de tipos celulares en que podía utilizarse, a todos aquellos que podían ser transfectados y no sólo a aquellos cuyo tamaño permitía la microinyección de la AEQ; pero además, introdujo la posibilidad de dirigir la AEQ a compartimentos subcelulares añadiendo las secuencias de localización subcelular, lo que le dio un nuevo ímpetu a su uso como sensor de Ca^{2+} .

4.2.2 Estructura y funcionamiento de la ecurina

La AEQ es una proteína formada por la apoAEQ y un grupo prostético, el luminóforo celenterazina. La apoAEQ está compuesta a su vez de 189 aminoácidos, que dan lugar a una proteína de aproximadamente 22.000 Daltons. De la secuencia de nucleótidos se puede deducir que la AEQ presenta tres dominios E-F, estructuras características de los sitios de unión de Ca^{2+} , conocidos como manos de Ca^{2+} , con alta homología con los sitios de unión de Ca^{2+} de la calmodulina bovina y de alta afinidad por Ca^{2+} . (Inouye y col., 1985).

La emisión de luz por parte de la AEQ es dependiente de dos factores: uno es la presencia del grupo prostético celenterazina y el otro es la presencia de iones Ca^{2+} . Cuando tres iones Ca^{2+} se unen al complejo apoAEQ-celenterazina, el grupo prostético sufre una oxidación a celenteramida, concomitante con la liberación de una molécula de CO_2 y la emisión de un fotón de luz a 466 nm (luz azul). (Figura 8). Esta reacción es irreversible y consume las moléculas de AEQ.

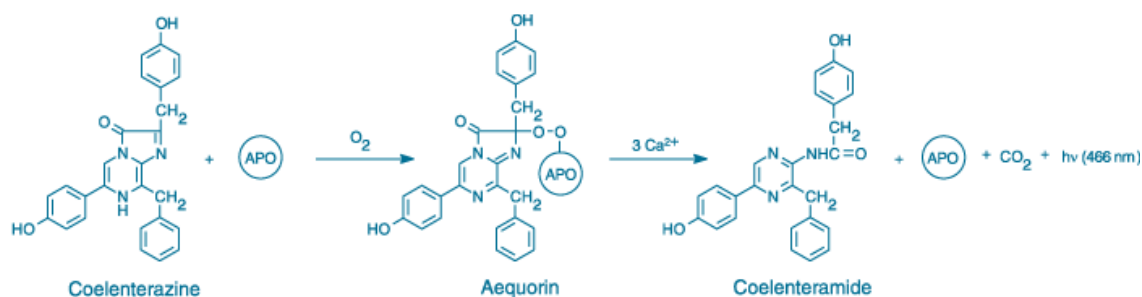


Figura 8: Reacción de la AEQ. En un primer paso se une la celenterazina a la apoAEQ. Después, la unión de 3 iones de Ca^{2+} desencadena la reacción irreversible de oxidación de la celenterazina con emisión de luz

4.2.3. Calibrado de la AEQ

La señal de luminiscencia de la AEQ puede ser transformada en un valor de concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$). Para poder traducir los valores de luminiscencia en términos de $[\text{Ca}^{2+}]$ se necesita conocer la luminiscencia total que puede emitir la muestra. Por eso, al finalizar cada experimento se superfunde una solución de lisis celular consistente en una concentración saturante de Ca^{2+} (10 mM) y 100 μM de digitonina, a fin de quemar la AEQ remanente.

Necesitamos conocer este parámetro dado que las curvas de calibración relacionan el $\log L/L_{\max}$ con el pCa ($-\log [\text{Ca}^{2+}]$). Los datos de luminiscencia se almacenan en un archivo informático cada 50 ms. Para hacer la transformación de estos datos en $[\text{Ca}^{2+}]$, un programa informático hace la media del valor de luminiscencia para cada punto, sustrae la luminiscencia de fondo o basal y calcula la fracción L/L_{\max} para cada punto a lo largo del experimento. L representa la luminiscencia media de cada punto menos la basal y L_{\max} es la integral de la luminiscencia menos la basal desde ese punto hasta el final del experimento (dado que la AEQ se va consumiendo progresivamente a lo largo del experimento y esto hace disminuir el valor de L_{\max}). Los valores de L/L_{\max} son entonces convertidos en $[\text{Ca}^{2+}]$ mediante el siguiente algoritmo matemático:

$$[\text{Ca}^{2+}] \text{ (en M)} = \frac{\text{Cociente} + (\text{Cociente} \times K_{\text{TR}}) - 1}{K_{\text{R}} - (\text{Cociente} \times K_{\text{R}})}$$

Donde el cociente es:

$$\text{Cociente} = \left[\frac{L}{L_{\max} \times \lambda} \right]^{1/n}$$

Donde n es el número de sitios de unión a Ca^{2+} de la AEQ y λ es la constante de consumo de la AEQ a concentración saturante de Ca^{2+} .

4.2.4 Procedimiento experimental para la expresión y reconstitución de la AEQ en las células PC12

Para los experimentos de AEQ se sembraron las células en placas de 24 pocillos (Costar) con cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro (Menzel-glasser) recubiertos con poli-L-Lisina (0,01 mg/ml) a distintas densidades (4×10^5 para Control, $3,5 \times 10^5$ para Bcl2 y 2×10^5 para NMG) debido a sus distintas tasas de crecimiento. A las 24 h en cultivo se trasfectaron con la AEQ correspondiente. Los experimentos se realizaron a las 36-48 horas de la transfección.

Para la realización de este estudio hemos utilizado dos tipos de AEQ, la AEQ silvestre, de localización exclusivamente citosólica (Brini y col., 1995) y que puede monitorizar $[Ca^{2+}]$ hasta 10 μM . La AEQ mutada (mut-AEQ) en su posición 119 (Asp119 por Ala) para reducir su afinidad por Ca^{2+} , lo que permite a esta AEQ monitorizar rangos mayores de concentración que la forma silvestre (Kendall y col., 1992), desde 10 hasta 100 μM . La Mit-mut-AEQ contiene una señal de localización mitocondrial, en concreto la subunidad VIII de la citocromo C oxidasa (COX VIII) humana, entra en la matriz mitocondrial y una vez allí, el polipéptido señal es retirado por proteasas, liberando la Mit-mut-AEQ a la matriz mitocondrial (Rizzuto y col., 1992). Los vectores con las distintas AEQs fueron amablemente cedidos por el Prof. Tullio Pozzan.

Para la introducción de los vectores en las células se utilizó un agente de transfección llamado Metafectene[®] (Biontex). Es un lípido policatiónico capaz de formar liposomas que engloban el ADN, cargado negativamente. Estos complejos liposoma-ADN, al entrar en contacto con las células, son endocitados al citosol. Una vez allí, las bombas de protones de los endosomas bombean protones para disminuir el pH del endosoma y por desequilibrio osmótico liberan al citosol el contenido del mismo. Debido al ambiente ácido del endosoma en su fase tardía, la estructura de los liposomas se debilita debido a cambios en la carga del lípido, de forma que al romperse el endosoma se libera al citosol mayor cantidad de ADN libre. Solo queda que con la entrada de la célula en división, el

plásmido entre en el núcleo y la AEQ empiece a transcribirse y traducirse. Los experimentos se pueden realizar transcurridas 36-48h desde el momento de la transfección.

Tras la transfección, solo tenemos en la célula la apoproteína, por tanto hay que introducir la celenterazina para poder tener la proteína activa. Este proceso se conoce como reconstitución y para ello basta con poner las células en presencia de una concentración de 5 μM de celenterazina nativa, durante 1-2 horas previo al experimento, en una solución de Krebs-HEPES suplementada con 1% de una mezcla 1:1 de SBF y SC.

Para la realización del experimento, el cubreobjetos con las células cargadas con AEQ reconstituida se coloca en una cámara de perfusión construida al efecto, situada en íntimo contacto con un fotomultiplicador que se mantiene en una cámara oscura. El fotomultiplicador, a través de un discriminador de señal, transfiere los datos de luminiscencia a un sistema informático, que a su vez genera un archivo con los mismos. Dicho equipo ha de situarse en sitio oscuro para no perder señal, dado que la señal de bioluminiscencia emitida por la AEQ es muy leve (Figura 9).



Figura 9: Estructura básica del equipo necesario para la cuantificación de luz emitida por la AEQ en presencia de Ca^{2+} . Consta de una fuente de alimentación, una cámara de perfusión para las células, un fotomultiplicador para amplificar la señal y un equipo informático para almacenar la información.

La cámara de perfusión se conecta con un sistema de electroválvulas de 5 vías, con el que a lo largo del experimento podemos perfundir las células con distintas soluciones.

La solución básica de Krebs-HEPES contiene, en mM: 144 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 D-glucosa y 10 HEPES, pH= 7,4. La solución despolarizante tiene la misma composición, solo que la concentración de K⁺ se aumentó hasta 75 mM y para mantener la osmolaridad, se redujo la de NaCl hasta 74,9 mM. En los experimentos que lo requerían, tanto la solución básica como la despolarizante se suplementaron con los correspondientes fármacos.

Para los experimentos de “mitocondria in situ” o de células permeabilizadas, la solución básica que se utiliza para estabilizar las células es igual, solo que se sustituye el CaCl₂ por 100 μM EGTA. La solución de permeabilización que se superfundía después de la estabilización contenía, en mM: 130 KCl, 10 NaCl, 1 K₃PO₄, 1 ATP- K, 5 succinato sódico, 10 HEPES, y 20 μM digitonina, pH 7,4 suplementada con 1 mM EGTA. Tras los 30 s de permeabilización, se superfundió con una solución de igual composición que la de permeabilización pero sin digitonina y con 0Ca²⁺ /100 μM EGTA. Para la estimulación de las mitocondrias se utilizó una solución intracelular en la que se sustituyó el EGTA por una concentración de Ca²⁺ libre conocida.

Por ultimo, todos los experimentos se finalizan con una solución de concentración saturante de CaCl₂, de composición igual que la solución de Krebs-HEPES básica a la que se le aumentaba el CaCl₂ hasta 10 mM y se suplementaba con 100 μM de digitonina.

4.3 Determinación de la expresión de Bcl2

4.3.1 Detección de la expresión de Bcl2 por western blot

Realizamos mediante western blot la detección de la expresión de Bcl2 en lisados celulares procedentes de cultivos celulares o de muestras de cirugía realizada a pacientes epilépticos resistentes a la medicación.

Para preparar el extracto de un cultivo celular se sembraron $1,5 \times 10^6$ células control y Bcl2 en placas p60. Las células NMG se sembraron a la misma densidad y se transfectaron con el plásmido que codifica la proteína Bcl2, sólo o en cotransfección con la Cit-AEQ y se mantuvieron en cultivo entre 24 y 48 horas tras la transfección, momento en que se realizaron los lisados celulares.

Las muestras procedentes de cirugía se congelaron a -80°C en Neg -50 (Frozen section medium, Richard-Allen Scientific) el día de la cirugía. Tras descongelarlas, se lavaron con PBS y se homogeneizaron en el tampón de lisis con la ayuda de un homogeneizador mecánico

Se utilizó un tampón de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 10 mM, 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% DOC) en presencia de inhibidores de proteasas ("complete cocktail tablets", Roche). Se incubaron los extractos 30 minutos a 4°C y se centrifugaron a $13000\times g$ en una microcentrifuga durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante con las proteínas solubilizadas y se conservaron a -80°C . La concentración se determinó por el método de Lowry (BCA "protein Assay kit", Pierce) usando BSA como referencia.

Para realizar la electroforesis se siguió un método ampliamente descrito (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles de acrilamida al 4% y al 12% para concentrar y separar las proteínas respectivamente. Cada carril se cargó con 50 μg de proteína total con tampón de carga de Laemmli (Glicerol 10%, SDS 10%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, azul de bromofenol). Como marcador de peso molecular se utilizó el SeeBlue[®]Plus2 Prestained Standard (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a lo largo de la noche a una membrana de nitrocelulosa (Roche), a un voltaje de 30 mV. Tras visualizar las proteínas transferidas en la membrana por tinción con rojo Ponceau S, se bloqueó la membrana con un 5% de leche desnatada en TBS-T (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH=7.2, 0,1% Tween 20)

Las membranas se incubaron durante la noche en solución de bloqueo con los anticuerpos anti-Bcl2 (Santa Cruz, monoclonal de ratón, 1:1000 para los extractos de cultivos y 1:200 para los extractos de tejido humano) y anti- β tubulina (Santa Cruz, monoclonal de ratón, 1:2500) Tras lavar tres veces con TBS-T, el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano (Pierce) se incubó a una dilución 1:2500. Las membranas se revelaron con el

método quimioluminiscente de Supersignal (Pierce). El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el software Kodak Image Station 2000MM System.

4.3.2 Inmunofluorescencia

Para detectar la localización de la proteína Bcl2 en las células control y Bcl2 se realizaron ensayos de inmunotinción con anticuerpos primarios y secundarios marcados con fluoróforos, siguiendo el método utilizado por Alés y col (2000).

Para los experimentos de inmunofluorescencia se sembraron células en placas de 24 pocillos con cubreobjetos recubiertos de poli-L-lisina a una densidad de $1,5 \times 10^5$ para control y Bcl2. Tras 24 horas en cultivo se sometió a las células control y Bcl2 a despolarizaciones de 1 s y 15 s con una solución de alto K^+ en presencia o ausencia de Bay K 8644. Posteriormente se fijaron con 3,7% de paraformaldehído durante 30 minutos. Se permeabilizaron durante 15 minutos en triton X-100 al 0,1%. Se lavaron varias veces en PBS y se incubaron durante 3 h con los anticuerpos primarios anti-Bcl2 (Santa Cruz, monoclonal de ratón 1:200) y anti α_{1D} (Alomone, monoclonal de conejo, 1:50) en la cámara húmeda. Tras lavar los cristales 3 veces en PBS, los primarios se revelaron por incubación durante 1 hora 45 minutos con anticuerpos secundarios (anti -ratón marcado con un fluoróforo verde para Bcl2 y anti- conejo marcado con un fluoróforo rojo para α_{1D} , dilución 1:1000 para los dos anticuerpos). Las preparaciones se examinaron con un microscopio confocal Leica AOBS con un objetivo de inmersión planapo 63X/1,32.

4.4 Registros electrofisiológicos ("patch clamp")

El "patch-clamp" es una técnica que permite cuantificar corrientes y voltajes de un pequeño trozo de membrana en sus variantes de fijación de voltaje y corriente (respectivamente). En la variante de fijación de voltaje se mantiene fijo el potencial de membrana del fragmento de membrana, de forma que se puede cuantificar la corriente de iones a su través mediante la medición de la cantidad de corriente que habría que aplicar para mantener constante el voltaje (Hamill y

col., 1981). En la variante de fijación de corriente se fija la corriente y se cuantifica la variación en el potencial de membrana causada por ésta.

Utilizamos las técnicas de patch clamp en fijación de voltaje con la configuración de célula entera y en fijación de corriente con la configuración de parche perforado para detectar corrientes de Ca^{2+} en el primer caso y potenciales de membrana en el segundo.

El primer paso en la técnica de patch clamp es la formación de un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana y una pipeta de cristal cuya punta ha sido pulida a fuego y que tiene un diámetro de aproximadamente 1 μm . Esta punta se aproxima a la membrana y se presiona contra ella, formando un sello de resistencia del orden de 50 M Ω . Esta elevada resistencia asegura que la mayoría de las corrientes van a fluir hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de corriente, además de asegurar un bajo nivel de ruido de los registros. En las condiciones adecuadas una ligera succión genera un giga-sello, un sello de resistencia entre 10 y 100 M Ω , que reduce el ruido en un orden de magnitud y permite fijar el potencial del parche de membrana, además de ser mecánicamente estable y permitir manipulaciones posteriores.

La configuración de célula entera se consigue cuando tras la obtención del giga-sello una ligera presión negativa causa la ruptura del parche de membrana, de forma que se comunican el interior de la pipeta y el medio intracelular y así se registra la actividad de la totalidad de los canales presentes en la membrana.

La configuración de parche perforado se consigue incluyendo en la solución del interior de la pipeta moléculas como la anfotericina B, que forma poros en el parche de membrana bajo la pipeta. En primer lugar hay que formar el giga-sello y después hay que dejar actuar la anfotericina sin aplicar ninguna presión negativa. Los poros formados por la anfotericina son permeables a iones monovalentes e impermeables a moléculas más grandes, lo que hace esta configuración especialmente útil para estudiar procesos dependientes de segundos mensajeros.

Para los experimentos de electrofisiología, se sembraron dos densidades distintas (25×10^4 y 50×10^4) tanto para células Control como para Bcl2 en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Los registros de patch clamp se realizaron mediante un amplificador EPC-10 (HEKA elektronik, Alemania) controlado por el programa PULSE v. 8.77 (HEKA elektronik, Alemania). Se estiraron pipetas de 4-6 M Ω de resistencia de cristal de borosilicato (Kimax 51, KIMBLE Glass Inc.) y se pulieron a fuego. Las soluciones se cambiaron con un sistema de perfusión con válvulas operadas manualmente (The Lee, Westbrook, CT, USA). La velocidad del flujo se reguló por gravedad hasta alcanzar una velocidad que permitiera reemplazar completamente la solución alrededor de la célula en menos de 1 s.

4.4.1 Registro de las corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) en configuración de célula entera y fijación de voltaje

Configuración de célula entera

Para determinar las corrientes a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (I_{Ca}) en control y Bcl2 se realizaron dos protocolos distintos en configuración de célula entera.

Protocolo A: A lo largo del experimento las células se perfundieron con una solución extracelular de Tyrode-HEPES (en mM: 137 NaCl, 10 HEPES, 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 CaCl_2 ; pH=7.4 ajustado con NaOH). Para la medición de las corrientes a través de canales de Ca^{2+} las células se superfundieron con una solución de Tyrode que contenía 10 mM de Ba^{2+} en lugar de Ca^{2+} como transportador de carga. La solución de la pipeta contenía (en mM) 10 NaCl, 100 CsCl, 20 tetraetilamonio Cl (TEA.Cl), 5 ATP-Mg 14 EGTA, 20 HEPES, 0.3 GTP-Na; pH= 7.2 ajustado con CsOH. Las células se mantuvieron a -80 mV y se les aplicaron pulsos despolarizantes de 50 ms a diferentes voltajes en intervalos de 10 s.

Protocolo B: Se utilizaron dos soluciones de las siguientes composiciones (en mM):

- Solución normal (NaCl 137, CaCl₂ 2, KCl 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, glucosa 10, pH 7.4 con NaOH)
- Solución de TEA (en mM): TEA.Cl 137, CaCl₂ 5, KCl 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, glucosa 10, pH 7.4 con TEA.OH.

Las células se sellaron en solución normal; una vez conseguida la configuración de célula entera se aplicó la solución de TEA a lo largo del resto del experimento. Después, se perfundió una solución con 1 mM Bay K 8644 durante 30 s. La solución de la pipeta contenía (en mM): CH₃CsO₃S 160, HEPES 10, EGTA 10, ATP- Mg 5, GTP-Na 0.3. La I_{Ca} se registró a una velocidad de 20 KHz

Configuración de parche perforado

Se utilizó anfotericina-B a la concentración de 500 µg /ml como agente perforante. Las pipetas se sumergieron en una solución intracelular sin anfotericina-B de composición (en mM, KCl 55, glutamato K 75, NaCl 8, ATP- Mg 5, GTP-Na 0.3, HEPES 10) y después se rellenó con una solución intracelular con anfotericina-B. Ya rellena, se aproximó la pipeta a la célula y la célula se selló rápidamente en el modo de fijación de voltaje en aproximadamente 3 a 10 min. La resistencia decreció hasta los 20 MΩ. Es en este momento cuando comienza la medida del potencial de membrana. La pipeta de perfusión, situada a 100 µm de la célula, comenzó a perfundir la célula con una solución extracelular (en mM, NaCl 137, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, KCl 5.33, HEPES 10, glucosa 10). En este punto se cambió el modo de fijación de voltaje a fijación de corriente. Se inyectó corriente a 0pA y se registró el voltaje durante 30 s. A los 10 s de comenzar el registro se cambió la solución extracelular por otra solución rica en K⁺ (en mM NaCl 67.3, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, KCl 75, HEPES 10, glucosa 10) durante 10 s. Después se lavó la solución durante otros 10 s.

4.5 Análisis estadístico

Los valores estadísticos se representan como la media \pm error estándar. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante el test de la t de Student o el análisis ANOVA, cuando se requería. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron significativas con un valor de p menor de 0,05

5. Resultados

5.1 Determinación de la expresión de la proteína Bcl2 en células PC12

En primer lugar, procedimos a la detección de la expresión de la proteína Bcl2 mediante la técnica de western blot, en extractos obtenidos a partir de cultivos de células Control y Bcl2, y en células NMG transfectadas con el cADN que codifica para Bcl2 sólo o cotransfectado con el plásmido para Cit-AEQ. La tubulina nos sirvió como proteína control de carga. Los resultados se representan como una relación de la intensidad (en unidades arbitrarias) de la banda de Bcl2 y la banda de tubulina.

Encontramos que en las células control la proteína Bcl2 era indetectable, mientras que en las células Bcl2, su expresión aumentaba hasta 200 veces con respecto al control. En el caso de las células a las que se indujo una expresión transitoria de Bcl2, encontramos que al transfectar solo Bcl2, la expresión de la proteína aumentaba 47 veces con respecto a Control, mientras que cuando se transfectó Bcl2 en compañía de la Cit-AEQ, la expresión aumentó hasta 55 veces con respecto al control.

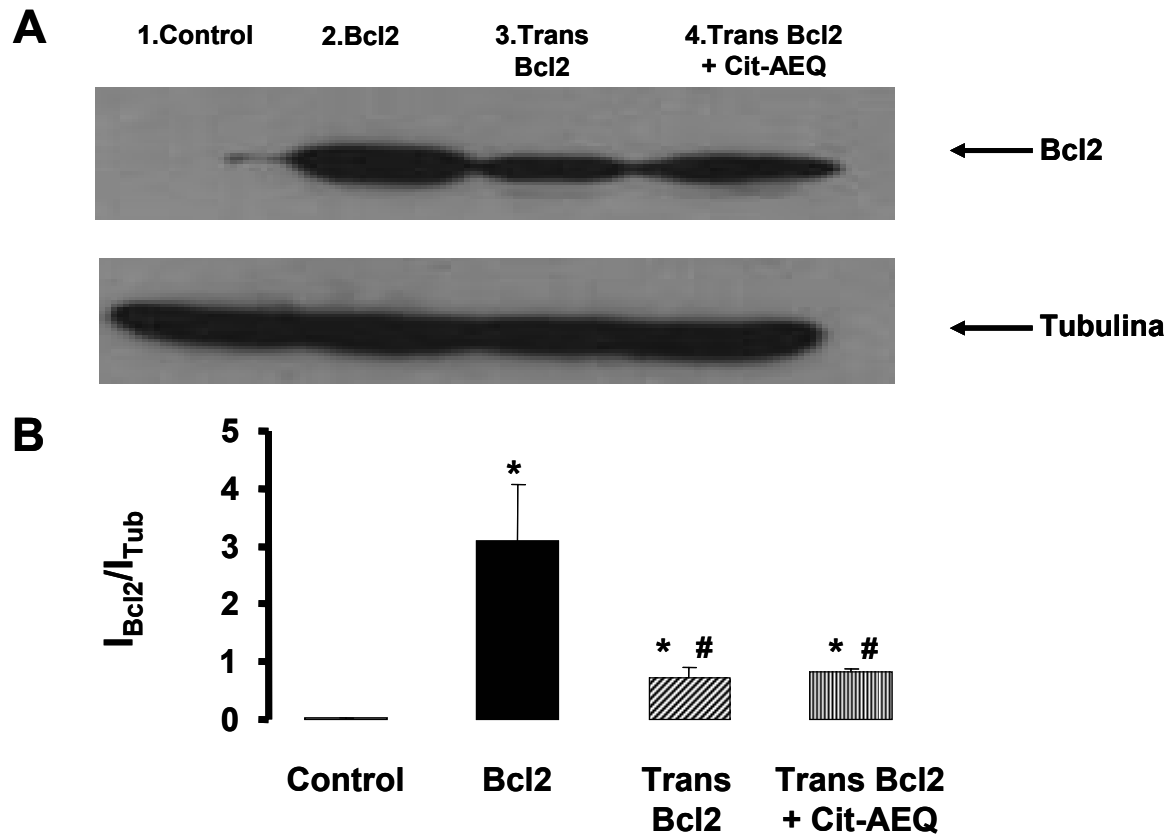


Figura 10: En el panel A se pueden observar las bandas de Bcl2 correspondientes a lisados de células control (carril 1) Bcl2 (carril 2), Bcl2 transitorias (carril 3) y Bcl2 transitorias transfectadas con el cADN para Cit-AEQ (carril 4). Las transfecciones se realizaron 36 h antes de realizar el lisado. El panel B muestra los datos cuantitativos normalizados con respecto a tubulina. Los datos son medias de 3 experimentos similares realizados con tres cultivos diferentes. Se realizó un test ANOVA (* $p < 0,05$ con respecto a control, # $p < 0,05$ con respecto a Bcl2)

5.2 Monitorización del $[Ca^{2+}]_c$ en células Control y Bcl2

Con el fin de determinar la influencia de la expresión de Bcl2 sobre el $[Ca^{2+}]_c$ procedimos a estudiar los cambios de $[Ca^{2+}]_c$ evocados por pulsos de alto K^+ con la proteína bioluminiscente genéticamente codificada eucorina. La Cit-AEQ, al contrario que las sondas sintéticas, no se distribuye fuera del citosol y permite transformar la señal de luminiscencia emitida por la AEQ en una concentración de Ca^{2+} , tal como se explicó en la página 34 en la sección de Materiales y Métodos.

Como muestra la figura 11, que contiene registros tipo de eucorina citosólica, al someter a las células control a una despolarización de 10 s con un alto K^+ (75 mM), la $[Ca^{2+}]_c$ aumentó desde un valor basal aproximado de $0,1 \mu M$ hasta alcanzar un

máximo de alrededor de 2,5 μM en 9 s, con una constante de activación (τ_{act}) de 9,4 s. Después, la señal decayó con una constante de inactivación (τ_{inact}) de 13,1 s hasta alcanzar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal previa al estímulo en alrededor de 29 s. En el caso de las células Bcl2, una despolarización similar a la aplicada a las células control hizo aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ desde el valor basal de 0,1 μM hasta un valor máximo de 0,8 μM que se alcanzó en 8 s, con una τ_{act} de 5,17 s para posteriormente decaer con una τ_{inact} de 9,22 s.

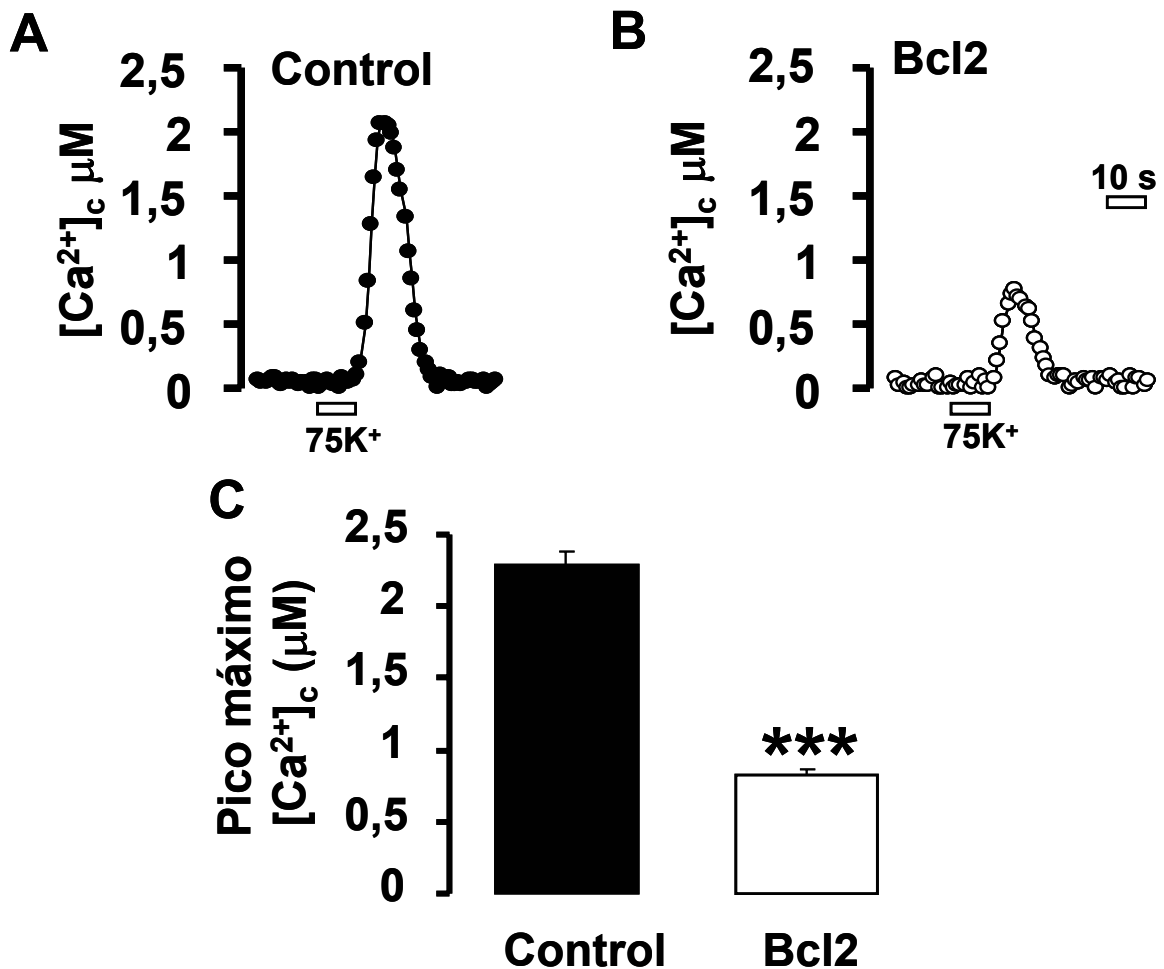


Figura 11: En el panel A se muestra un registro típico de Cyt-AEQ en células control. Se puede observar el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tras una despolarización con 75 mM de K^+ durante 10 s. En el panel B se observa el mismo tipo de registro pero en células Bcl2. En estos registros típicos queda patente la drástica disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que tiene lugar en las células Bcl2. El panel C muestra las medias de las amplitudes del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en respuesta a 75 mM de K^+ ($n=27$, 10 cultivos). *** $p < 0,001$ con respecto a control mediante análisis con el test de la T de Student.

En la figura 11C se muestran la $[Ca^{2+}]_c$ media de 27 experimentos procedentes de 10 cultivos distintos. El valor medio de $[Ca^{2+}]_c$ máximo fue de aproximadamente 2,3 μM para Control y 0,83 μM para Bcl2. La τ_{act} media fue de alrededor de 6,89 s para Control y de 6,94 s para Bcl2. No presentaban una diferencia significativa. La τ_{inact} media fue de 12,15 s y 17,06 s para Control y Bcl2, respectivamente. Tampoco en este caso se encontró diferencia significativa entre Control y Bcl2.

5.3 Monitorización de la $[Ca^{2+}]_m$ con Mit-mut-AEQ en células Control y Bcl2.

Una menor concentración de Ca^{2+} citosólico en las células Bcl2 podría explicarse en el caso de que las mitocondrias estuvieran captando mas eficazmente el Ca^{2+} en estas células que en las control. Para comprobar esta hipótesis monitorizamos el aumento de la $[Ca^{2+}]_m$ en respuesta a una despolarización de 10 s con 75 mM de K^+ , situación en la que la mitocondria acumula grandes cantidades de Ca^{2+} en otros tipos celulares como la célula cromafín bovina (Villalobos y col., 2002; Montero y col., 2000). Para ello utilizamos la Mit-mut-AEQ, capaz de detectar concentraciones elevadas de Ca^{2+} mitocondrial.

Los resultados obtenidos en esta aproximación remedaban los obtenidos en Ca^{2+} citosólico. Las figuras 12A y 12B muestran registros típicos de Mit-mut-AEQ en células Control y Bcl2 respectivamente. La estimulación con alto K^+ produjo una elevación de la $[Ca^{2+}]_m$ en las células control que alcanzó un valor máximo de 83 μM con una τ_{act} de 9,41s partiendo de un valor basal próximo a 0,5 μM para posteriormente decaer con una τ_{inact} de 16,54 s. En el caso de las células Bcl2 el estímulo de 10 s con alto K^+ provocó un aumento en la $[Ca^{2+}]_m$ que alcanzó un valor máximo de 22 μM con una τ_{act} de 11,26 s para decaer con una τ_{inact} de 20,82 s. La $[Ca^{2+}]_m$ volvió a valores basales en 67 s en el caso de las células control y en 54 s para las Bcl2.

La figura 12C muestra la $[Ca^{2+}]_m$ media de 20 experimentos procedentes de 9 cultivos distintos. En el caso de las células control este valor fue de 84 μM mientras

que para Bcl2 fue de 19 μM . No se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos celulares para las τ de activación e inactivación.

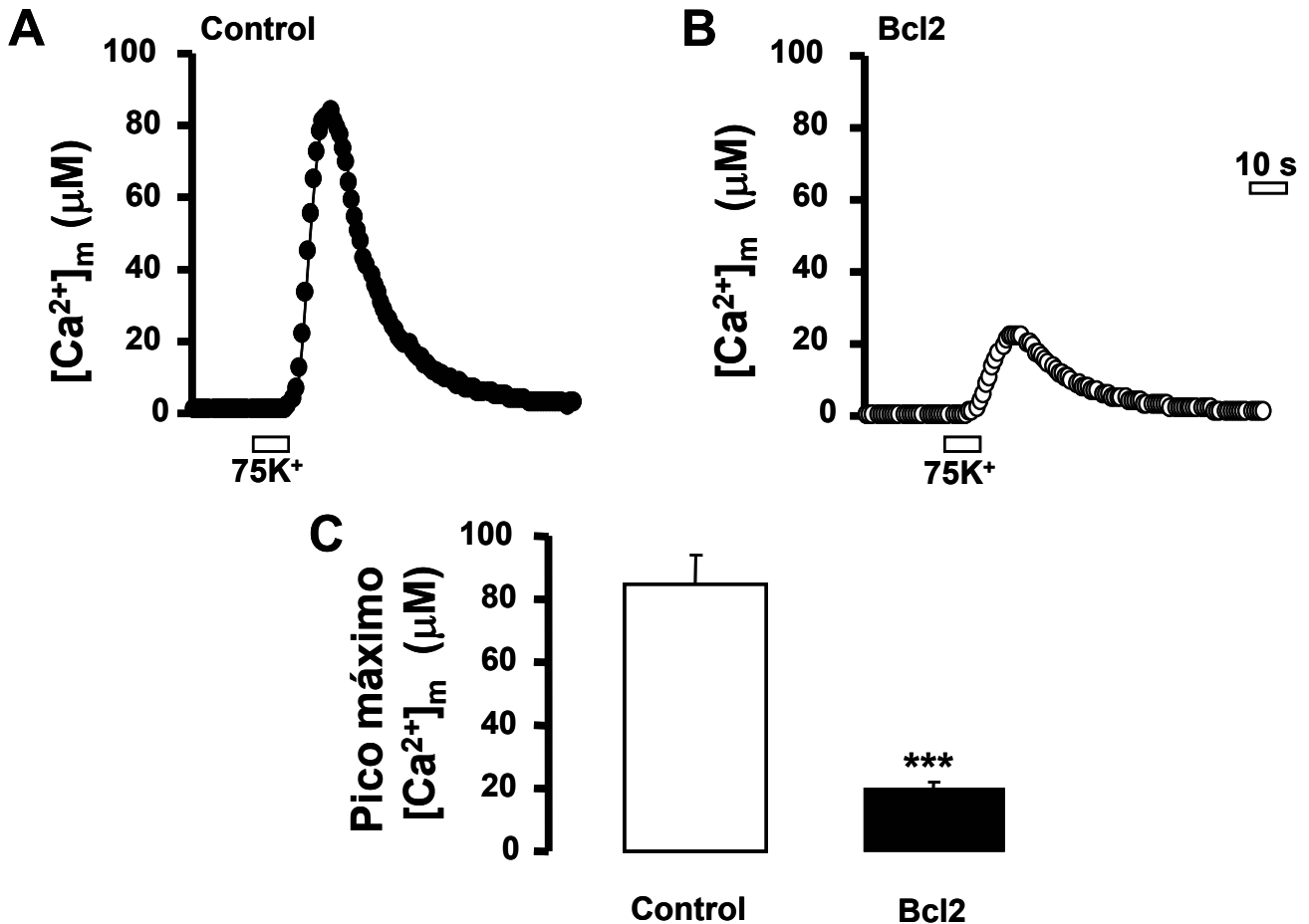


Figura 12: En el panel A, células Control transfectadas con Mit-mut-AEQ se sometieron a una despolarización de 10 s con alto K^+ (75 mM). Se observó un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, al igual que ocurrió con la Cyt-AEQ. En el panel B el mismo tipo de protocolo, pero en células Bcl2, resulta en un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ de mucha menor intensidad que el observado en las células control. El panel C muestra las medias de las amplitudes del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en respuesta a 75 mM de K^+ ($n=20$, 10 cultivos). *** $p<0,001$ con respecto a control mediante análisis con el test de la T de Student.

5.4 Efectos de la cafeína sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en células Control y Bcl2

Los efectos de Bcl2 sobre el Ca^{2+} del retículo generan una amplia controversia en la comunidad científica. Hay gran cantidad de trabajos dedicados a dilucidar el efecto

que la expresión de dicha proteína realiza sobre el Ca^{2+} reticular (Distelhorst y col., 2004). Los más recientes postulan que Bcl2 disminuye los depósitos de Ca^{2+} del retículo realizando medidas directas de éste.

Quisimos comprobar qué ocurría con el retículo endoplásmico en nuestro modelo celular y para ello utilizamos cultivos de células control y Bcl2 que expresaban Mit-mut-AEQ y las sometimos a una estimulación con cafeína 20 mM en pulsos de 10 s de duración.

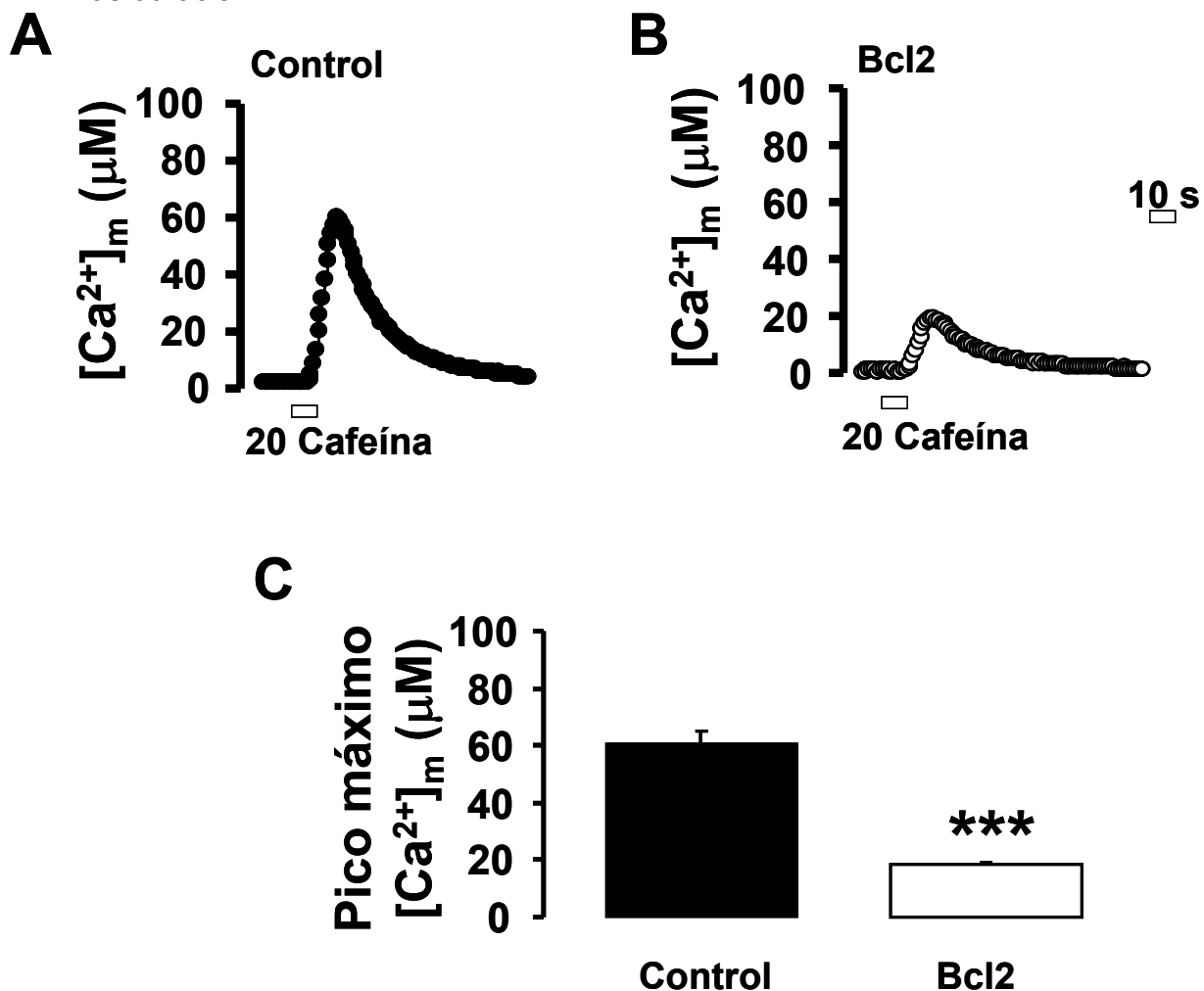


Figura 13: El panel A muestra un registro típico de Mit-mut-AEQ en células Control al ser sometidas a un estímulo de cafeína 20 mM de 10 s de duración en el que se observa el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ causado por este estímulo. En el panel B se representa el mismo tipo de registro pero en células Bcl2. La cafeína induce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ menor con respecto a la respuesta de la células Control. El panel C muestra las medias de las amplitudes del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en respuesta a 20 mM cafeína (n=12, 4 cultivos). *** $p < 0,001$ con respecto a control mediante análisis con el test de la T de Student

En esta situación, en células Control desde una basal de $1,65 \mu\text{M}$, la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ alcanzó un valor de $61 \mu\text{M}$ para las células control (Figura 13A) al ser estimuladas con cafeína. En el caso de las células Bcl2 desde una basal de $0,6 \mu\text{M}$ el estímulo de cafeína hizo aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ hasta un máximo de $18 \mu\text{M}$ (Figura 13B).

Estos resultados coinciden con diversos trabajos que asocian unos niveles disminuidos de Ca^{2+} reticular con la sobreexpresión de Bcl2 (Lam y col., 1994; He y col., 1997; Pinton y col., 2000; Pinton y col., 2001; Foyouzi-Youssefi y col., 2000; Vanden-Abeelee y col., 2002). Podemos deducir de ellos que en nuestro modelo celular los depósitos de Ca^{2+} están disminuidos en las células Bcl2 con respecto al control.

Los experimentos realizados hasta el momento sugerían que Bcl2 desempeñaría un papel modulador en la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) del subtipo L. Por ello, comenzamos a explorar los efectos de Bcl2 sobre la captación mitocondrial de Ca^{2+} y la entrada de Ca^{2+} al nivel de la membrana plasmática.

5.5 Efectos de Bcl2 sobre la capacidad tamponadora de Ca^{2+} de la mitocondria

Los resultados obtenidos hasta este punto nos indican que la entrada de calcio inducida por alto K^+ está disminuida en las células Bcl2, bien medido con la Cit-AEQ o midiendo $[\text{Ca}^{2+}]_m$ con la Mit-mut-AEQ. Para determinar la contribución capacidad tamponadora de la mitocondria en las células Bcl2 optamos por realizar los siguientes experimentos manipulando la mitocondria. El Ca^{2+} , tanto al entrar a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes como al salir del retículo a través de los receptores de rianodina o de IP_3 , genera un microdominio de alta $[\text{Ca}^{2+}]$ que se va disipando a medida que aumenta la distancia con la fuente de liberación de Ca^{2+} al citosol. Podría estar ocurriendo que la mitocondria en células Bcl2 estuviera más alejada de estas fuentes, lo que la enfrentaría a una menor $[\text{Ca}^{2+}]$ y explicaría la disminución en la respuesta observada con respecto a control.

Para comprobar esta hipótesis trabajamos en situación de "mitocondria in situ". Para ello permeabilizamos las células en solución intracelular suplementada con $20 \mu\text{M}$ de digitonina y 1 mM de EGTA. Tras la permeabilización, se sustituyó la

solución extracelular por una solución intracelular con $0\text{Ca}^{2+}/100\text{ }\mu\text{M}$ EGTA, para después estimular el uniportador con concentraciones crecientes de Ca^{2+} libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), desde $5\text{ }\mu\text{M}$ hasta $100\text{ }\mu\text{M}$. Monitorizamos los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ con Mit-mut-AEQ.

Ante una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $5\text{ }\mu\text{M}$, el pico de entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial alcanzó un valor máximo de $6\text{ }\mu\text{M}$ para las células Control (Figura 14A) y de $5\text{ }\mu\text{M}$ para Bcl2 (Figura 14B). No se encontró diferencia significativa entre estos dos valores (Figura 14C). Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ la aumentamos hasta $10\text{ }\mu\text{M}$, la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en respuesta a esta entrada de Ca^{2+} alcanzó un valor de $20\text{ }\mu\text{M}$ para Control (Figura 14D) y $29\text{ }\mu\text{M}$ para Bcl2 (Figura 14E). Tampoco en este caso se hallaron diferencias significativas, aunque si parece encontrarse una tendencia a una mayor captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias en las células Bcl2 (Figura 14F).

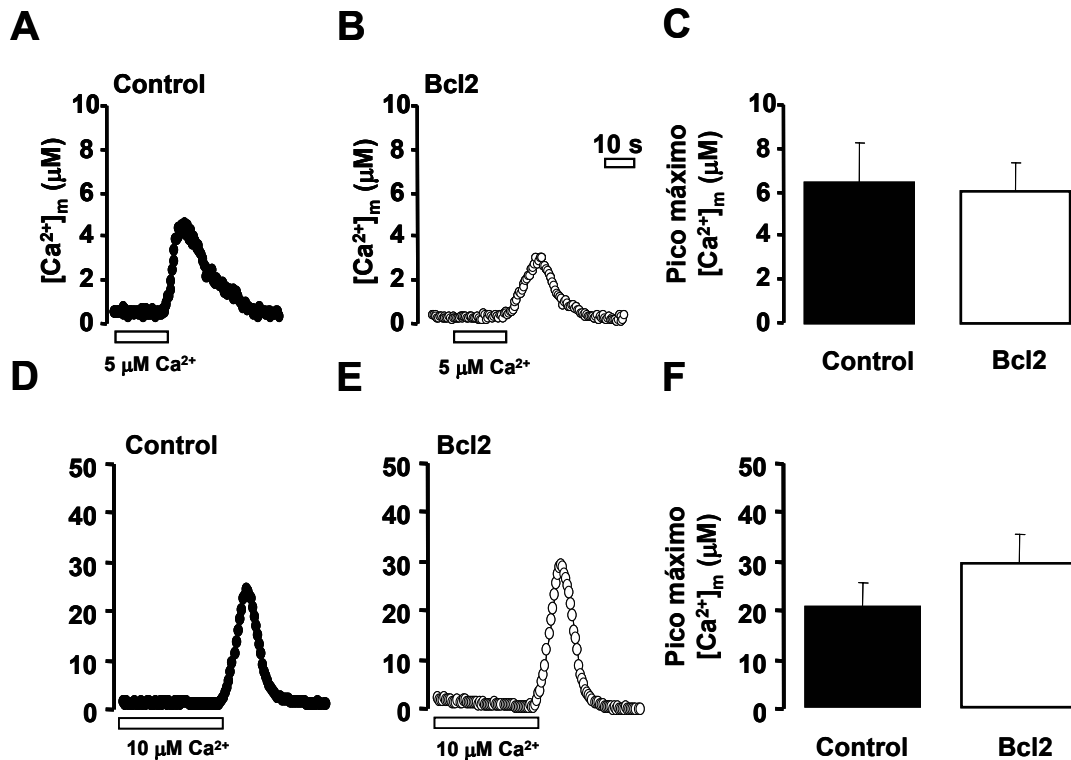


Figura 14: En el panel A, células control transfectadas con Mit-mut AEQ se permeabilizaron durante 30 s con $20\text{ }\mu\text{M}$ digitonina en solución intracelular para, después de estabilizarse la basal, ser expuestas a una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $5\text{ }\mu\text{M}$. En el panel B se observa el mismo protocolo pero esta vez en células Bcl2. El panel C muestra las medias de las amplitudes del pico máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en respuesta a $5\text{ }\mu\text{M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($n=9$, 3 cultivos). Los paneles D y E muestran registros típicos de "mitocondria in situ" en células Control y Bcl2 respectivamente al ser expuestas a $10\text{ }\mu\text{M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El panel F muestra las medias de las amplitudes del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en respuesta a $10\text{ }\mu\text{M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($n=14$ para Control y $n=17$ para Bcl2, 4 cultivos). El análisis por el test de la T de Student no mostró diferencias significativas entre los dos tipos celulares para ninguna concentración

La siguiente $[Ca^{2+}]_i$ testada fue de 30 μM , valor próximo a la K_m del uniportador, que es 43 μM (Montero y col., 2000). En la figura 15, al perfundir las "mitocondrias in situ" con 30 μM de Ca^{2+} libre, encontramos que mientras que en las células Control el valor de $[Ca^{2+}]_m$ alcanzado fue de 16 μM (Figura 15A), el valor de la $[Ca^{2+}]_m$ para las células Bcl2 fue de 42 μM (Figura 15B). El bloqueante específico del uniportador mitocondrial, rojo rutenio, a la concentración de 4 μM , bloqueó completamente la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en las mismas condiciones experimentales, lo que nos confirmó que, efectivamente, estábamos monitorizando la captación de Ca^{2+} por el uniportador mitocondrial (Figuras 15C y 15D, células control y Bcl2 respectivamente). En la Figura 16A se pueden observar las diferencias significativas en cuanto a la captación de $[Ca^{2+}]_m$ por parte del uniportador encontradas entre las células Control y Bcl2. Obsérvese que el uniportador mitocondrial de las células Bcl2 es más potente en su captación que en las células Control. En las células Control la $[Ca^{2+}]_m$ aumentó con una τ_{act} de 12 s y para las células Bcl2 este parámetro fue de 11 s (Figura 16B). La diferencia entre los parámetros no fue significativa. Tras alcanzar el pico máximo de $[Ca^{2+}]_m$, ésta decreció con una τ_{inact} de 22 s para células Control y 14 s para Bcl2 (Figura 16B). En este caso, la diferencia entre los parámetros sí fue significativa. Estos resultados nos indican que las mitocondrias de células Bcl2 captan 2,5 veces más Ca^{2+} que las de células control pero, además, lo liberan de vuelta al citosol dos veces más rápido que éstas.

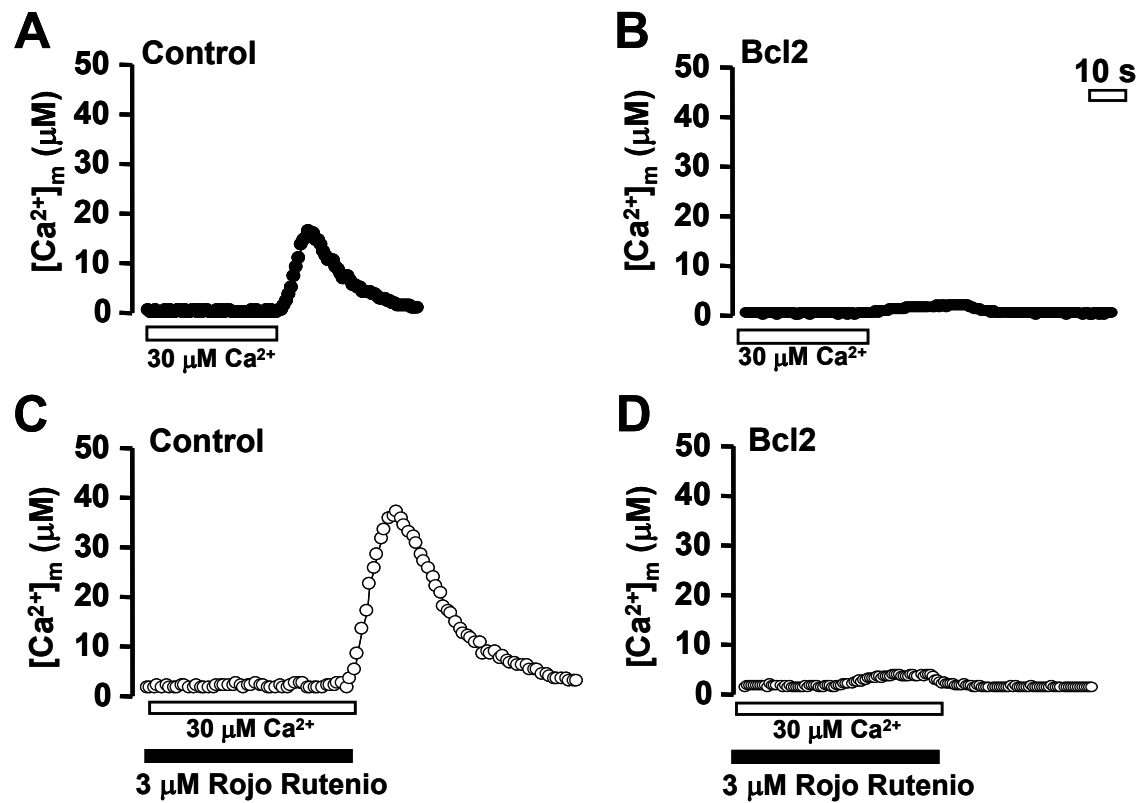


Figura 15: En los paneles A y B se muestran registros típicos de los cambios de la $[Ca^{2+}]_m$ obtenidos con la sonda Mit-mut-AEQ en "mitocondrias in situ", células permeabilizadas con digitonina, de células Control y Bcl2 (respectivamente) expuestas a una $[Ca^{2+}]_i$ de 30 μM . Los paneles C y D muestran registros típicos de células Control y Bcl2 expuestas a una $[Ca^{2+}]_i$ de 30 μM en presencia de 4 μM de rojo rutenio, en los que se puede comprobar la completa abolición de la capacidad tamponadora de Ca^{2+} por el rojo rutenio

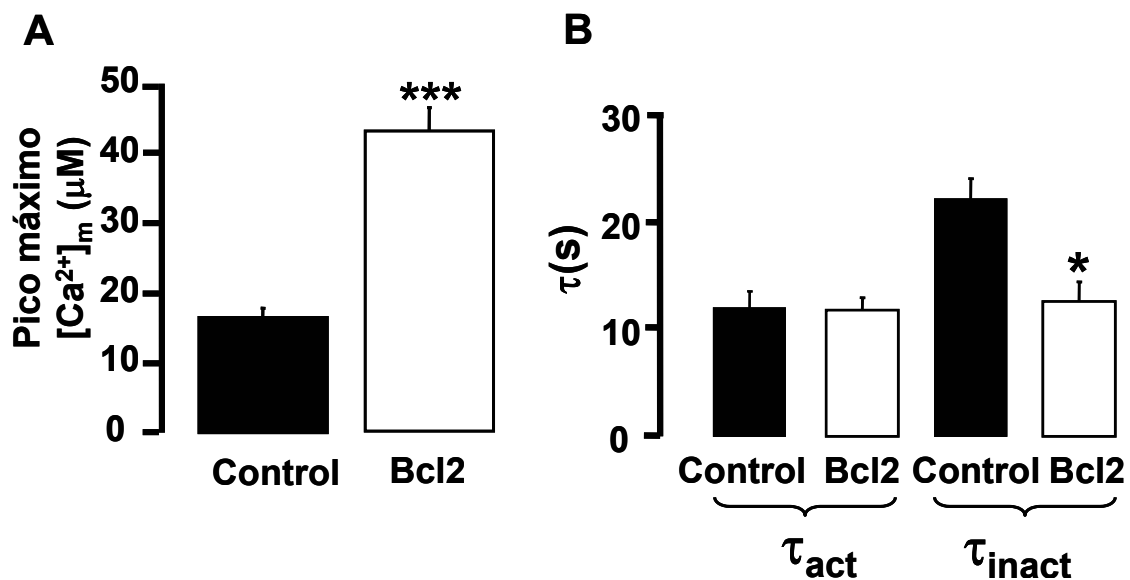


Figura 16: El panel A muestra las medias de las amplitudes del pico de $[Ca^{2+}]_m$ en respuesta a 30 μM de $[Ca^{2+}]_i$ (n= 13, 4 cultivos)(*** $p < 0,001$ con respecto a control). El panel B muestra el análisis de las τ de activación e inactivación para Control y Bcl2 expuestas a 30 μM de Ca^{2+} libre (* $p < 0,05$ con respecto a control). Las diferencias significativas se determinaron en ambos casos por el test de la T de Student

Por último utilizamos una $[Ca^{2+}]_i$ muy superior a la K_m del uniportador, 100 μM (Figura 17). En estas condiciones la $[Ca^{2+}]_m$ alcanzó un valor de 41 μM para células Control (Figura 17A) y 43 μM para células Bcl2 (Figura 17B). La diferencia entre estos dos parámetros no fue significativa, aunque la tendencia sí parece coincidir con los resultados anteriores según los cuales las mitocondrias de las células Bcl2 captan más Ca^{2+} que las controles. Probablemente esta ausencia de diferencia significativa se deba a que la $[Ca^{2+}]_i$ que utilizamos satura la capacidad del uniportador para transportar Ca^{2+} y enmascara los efectos debidos a Bcl2. La figura 17C resume las amplitudes máximas alcanzadas por la $[Ca^{2+}]_m$ al exponer las mitocondria in situ a 100 μM de $[Ca^{2+}]_i$. La figura 18 muestra un resumen de los valores máximos de $[Ca^{2+}]_m$ alcanzados frente a las $[Ca^{2+}]_i$ a que fueron expuestas las "mitocondrias in situ".

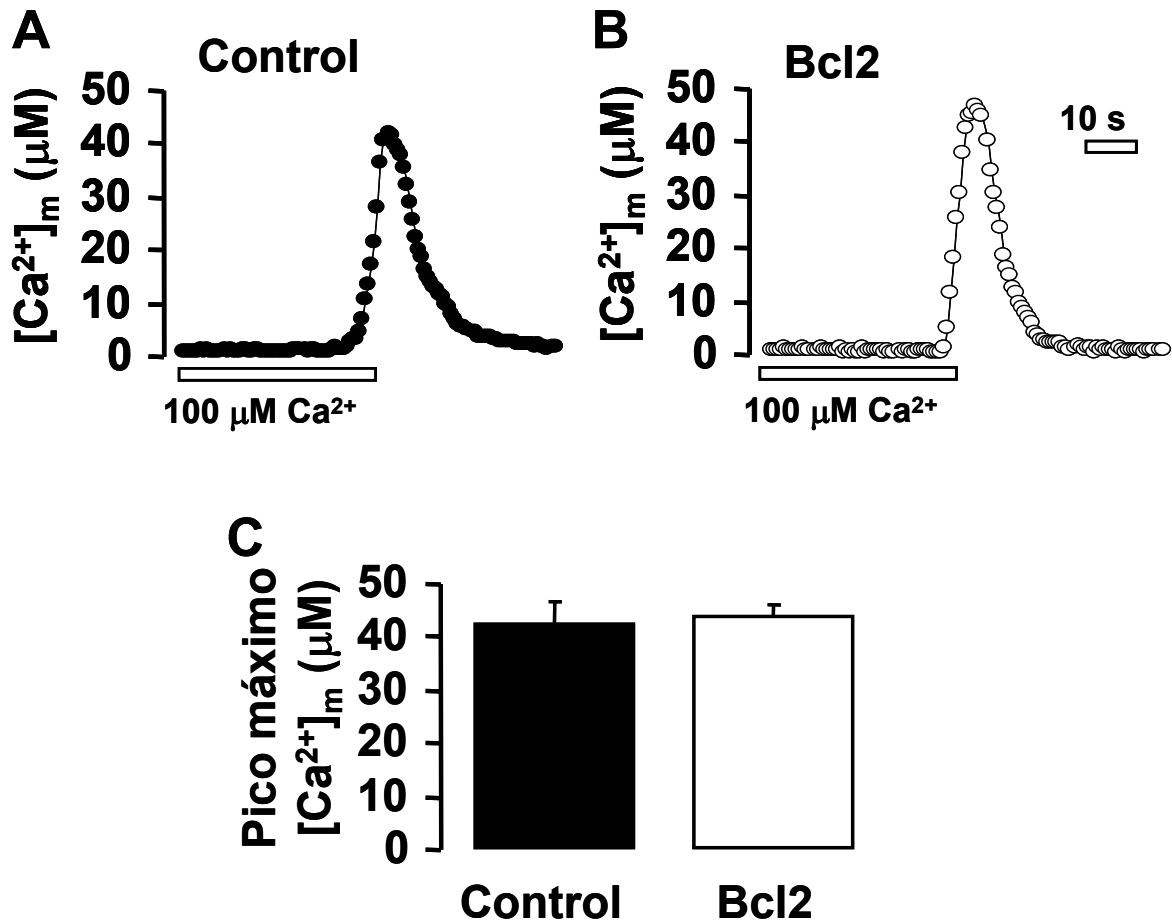


Figura17: En los paneles A y B se muestran registros típicos de Mit-mut-AEQ en "mitocondrias in situ" de células Control y Bcl2 (respectivamente) expuestas a una $[Ca^{2+}]_i$ de 100 μM . El panel C muestra las medias de las amplitudes del pico de $[Ca^{2+}]_m$ en respuesta a 100 μM de $[Ca^{2+}]_i$ ($n = 13$, 5 cultivos).

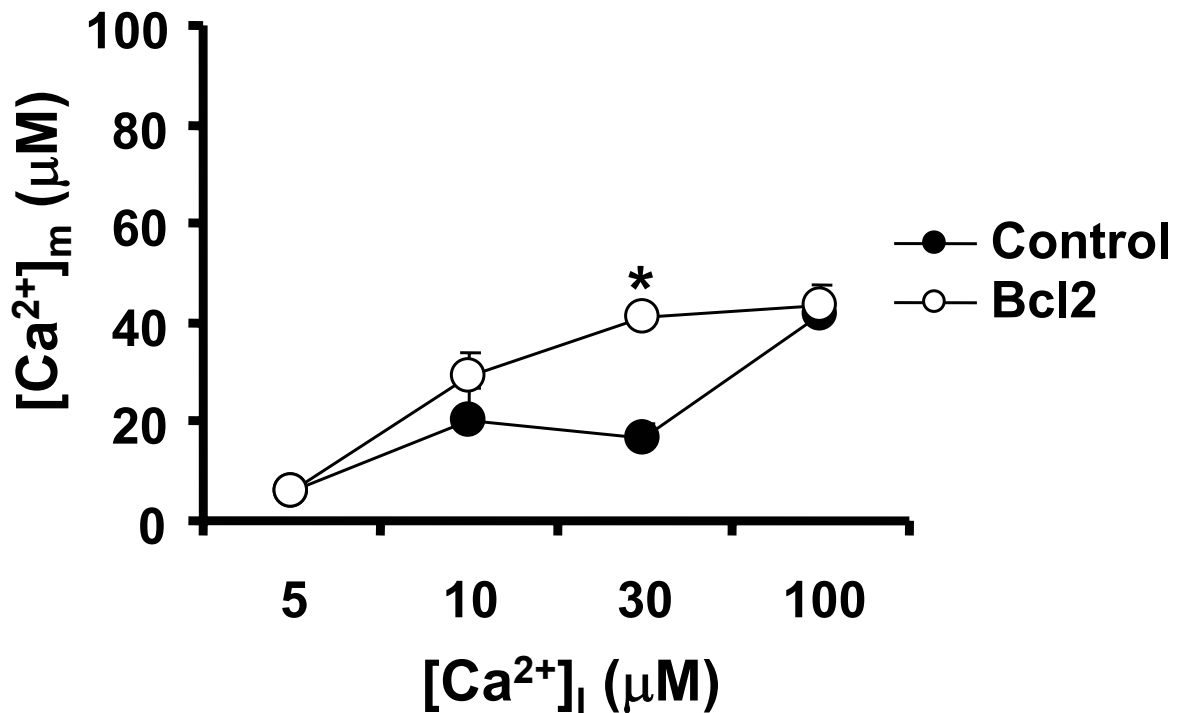


Figura 18: En el diagrama se enfrentaron las $[Ca^{2+}]_i$ a que se expuso a las "mitocondrias in situ" y las $[Ca^{2+}]_m$ alcanzadas. Como ya se había visto en los registros típicos, en valores alejados a la K_m del uniportador no se observan diferencias significativas en la captación de Ca^{2+} por la mitocondria. Al exponer las mitocondrias a una $[Ca^{2+}]_i$ de 10 μM se observó una tendencia en las células Bcl2 a captar mas Ca^{2+} que las células control, diferencia que fue significativa al exponer las células a una $[Ca^{2+}]_i$ de 30 μM (* $p < 0,05$ con respecto a control).

Los resultados hasta el momento indican que las mitocondrias de células Bcl2 captan más Ca^{2+} que las de células control, con lo que una aproximación en la que anuláramos la capacidad tamponadora de Ca^{2+} debería eliminar las diferencias observadas en los clones. Utilizamos el protonóforo FCCP, compuesto que disipa el gradiente protónico de la mitocondria, provocando la despolarización de ésta. De esta forma se disipa el gradiente electroquímico mitocondrial (Montero y col., 2000; Villalobos y col., 2002; Cano-Abad y col., 2001; Rizzuto y col., 2000) y en consecuencia la captación de Ca^{2+} por la mitocondria.

En las células PC12, el Ca^{2+} que accede al citosol lo hace mayoritariamente a través del canal de Ca^{2+} del subtipo L (Usowicz y col., 1990). Una despolarización con alto K^+ en presencia de FCCP 1 μM , como se observa en la Figura 19C, causó una elevación de la $[Ca^{2+}]_c$ de 5 μM mientras que en las mismas células en ausencia de FCCP, la $[Ca^{2+}]_c$ se elevó hasta 2 μM (Figura 19A). Sin embargo en las células Bcl2 observamos que la $[Ca^{2+}]_c$ no variaba en presencia o en ausencia de FCCP (Figuras 19B y 19D, respectivamente).

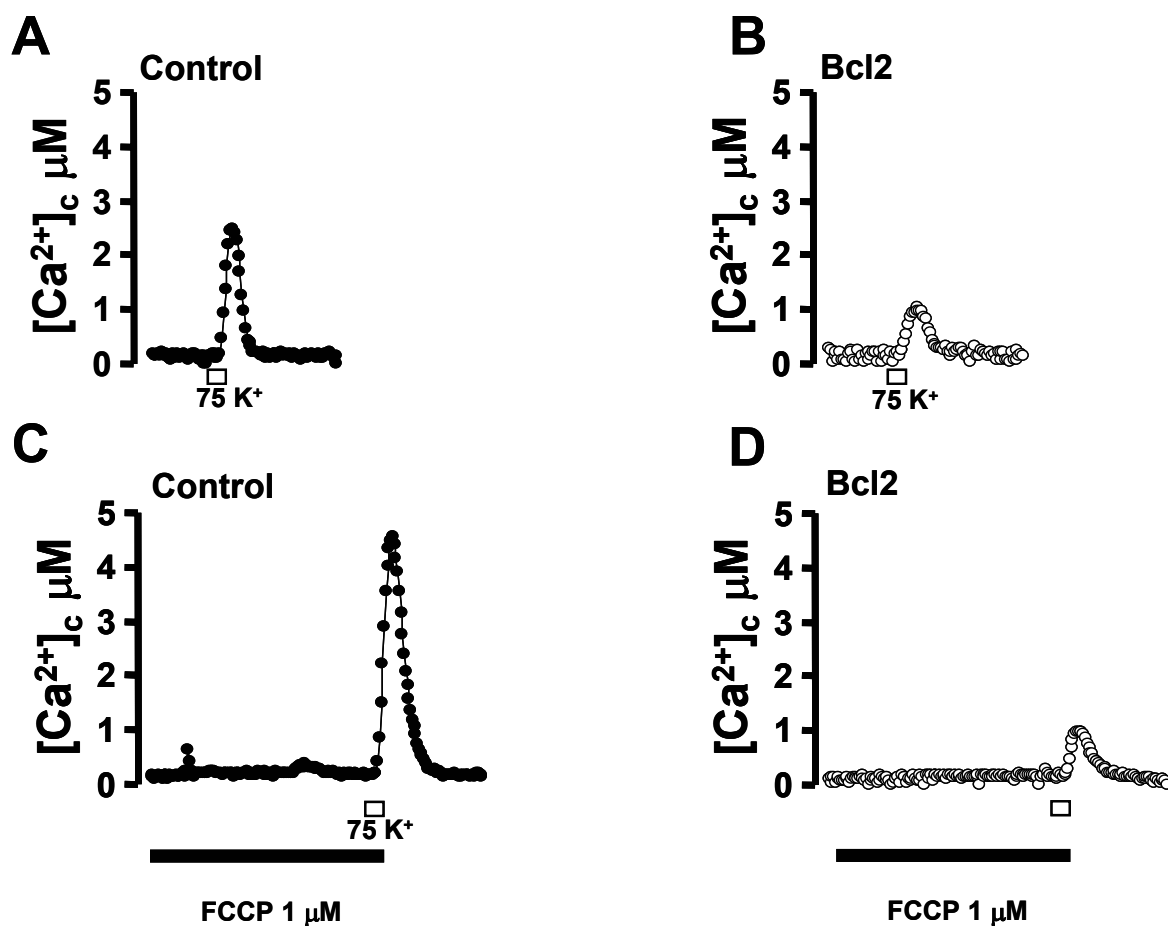


Figura 19: En los paneles A y B, células Control y Bcl2 transfectadas con Cyt-AEQ se sometieron a una despolarización control de 10 s con alto K^+ (75 mM). Se observó el aumento en la $[Ca^{2+}]_m$ previamente observado. En los paneles C y D se realizó la misma despolarización pero en presencia de 1 μM FCCP

Tal como se puede observar en la tabla, la presencia de FCCP solo es efectiva en las células Control mientras que en las Bcl2 no aumenta la $[Ca^{2+}]_c$ cuando se aplica el protonóforo.

	Control	Bcl2
FCCP (-)	2,29 $\mu M \pm 0,09$	0,83 $\mu M \pm 0,03$ *
FCCP (+)	3,68 $\mu M \pm 0,27$ * #	1,07 $\mu M \pm 0,05$ * ‡

Figura 20: Tabla 1, en la que se muestran las amplitudes máximas del pico de $[Ca^{2+}]_m$ en respuesta a 75 K^+ en presencia o ausencia de FCCP (n=8, 4 cultivos). * $p < 0,001$ con respecto a control # $p < 0,001$ con respecto a Bcl2 ‡ $p < 0,001$ con respecto a Control FCCP. Las diferencias significativas se analizaron por un test ANOVA.

5.6 Efectos de Bcl2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través del canal del subtipo L en células control y Bcl2

En nuestro modelo celular hemos demostrado que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en respuesta a una despolarización con alto K^+ estaba disminuida en Bcl2 con respecto a control, pero al abolir la capacidad tamponadora de la mitocondria con FCCP y someter a las células a un pulso despolarizante similar, el Ca^{2+} citosólico no se veía aumentado en las células Bcl2, tal como sería esperable y como de hecho ocurría en las células Control en esta situación. Estos resultados nos llevaron a sospechar que Bcl2 estaría afectando a la entrada de Ca^{2+} a través del canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente del subtipo L (CCVD tipo L).

Para comprobar esta hipótesis sometimos a las células Control y Bcl2 a despolarizaciones en presencia del agonista selectivo para el CCVD del subtipo L, Bay K 8644. En células Control y Bcl2 que expresan la Mit-mut- AEQ despolarizamos con alto K^+ (Figuras 21A y 21B respectivamente). Observamos que los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ fueron de 89 μM y 28 μM para Control y Bcl2 respectivamente. En presencia del agonista Bay K 8644 0,3 μM la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ fue de 199 μM para Control (figura 21C) y de 111 μM para Bcl2 (figura 21D). El antagonista de los CCVD tipo L, nimodipino (1 μM) abolió por completo la entrada de Ca^{2+} a través de dicho canal, como se refleja en las figuras 21E y 21F en ambos tipos celulares.

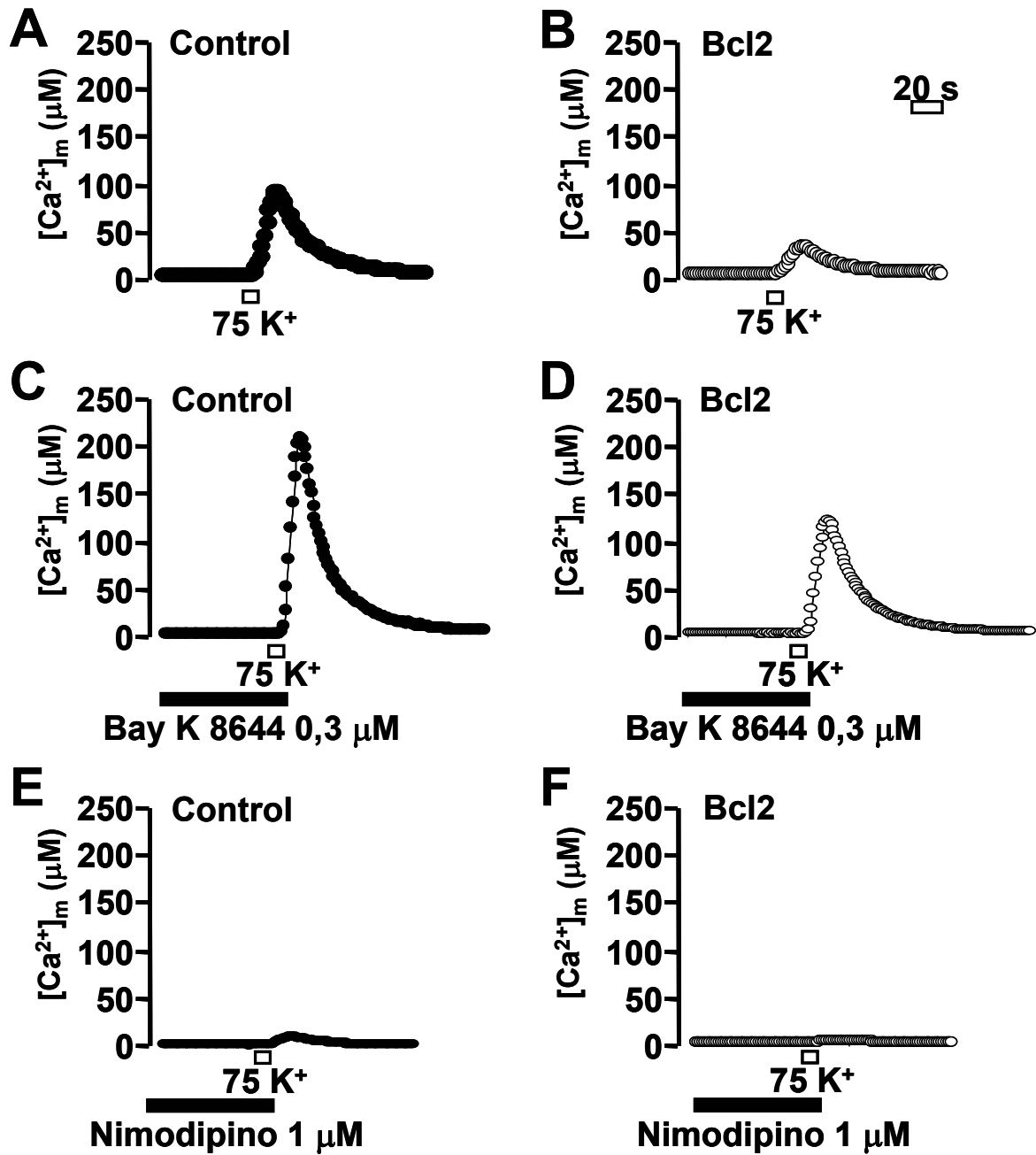


Figura 21: En el panel A, se muestran registros típicos de células control transfectadas con mit-mut AEQ, estimuladas con una despolarización de 10 s con alto K^+ . En el panel B, células Bcl2 se sometieron al mismo tipo de protocolo. En los paneles C y D (células Control y Bcl2 respectivamente) se muestran despolarizaciones realizadas en presencia de Bay K 8644 en las que se observa una potenciación en la entrada de Ca^{2+} con respecto a las despolarizaciones control de los paneles A y B. En los paneles E y F se observan registros típicos de despolarización en presencia de nimodipino (1 μ M).

La figura 22A muestra las medias de los picos máximos en los dos tipos celulares. Se puede comprobar la misma tendencia observada en los experimentos tipo; el

nimodipino prácticamente abolió la entrada de Ca^{2+} . Sin embargo el agonista de los CCVD del subtipo L, Bay K 8644 eleva de forma significativa la $[\text{Ca}^{2+}]_m$. En la Figura 22B hicimos una relación entre la captación de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ durante el estímulo con K^+ en control o Bcl2 en ausencia y en presencia de Bay K 8644; en otras palabras, calculamos así el aumento relativo inducido por Bay K 8644 en ambos tipos celulares, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\Delta\text{Ca}^{2+} = \frac{\text{Pico}_{\text{K} + \text{BayK 8644}}}{\text{Pico}_{\text{K}}}$$

Como se puede observar, el aumento relativo que ejerce Bay K 8644 es significativamente mayor en las células Bcl2

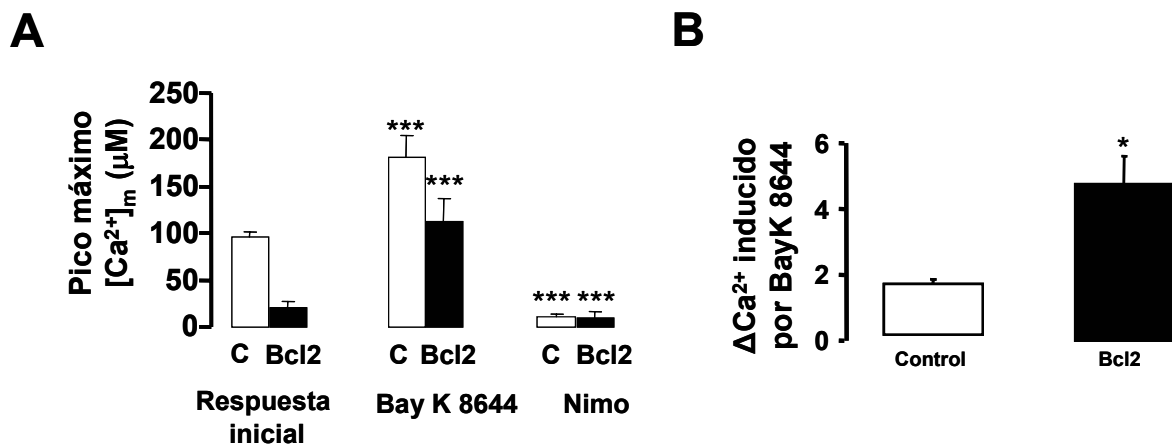


Figura 22: En el panel A se muestran las medias de las amplitudes del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en respuesta a la despolarización control, en presencia de Bay K 8644 y en presencia de nimodipino (***) ($p < 0,001$ con respecto a control). El panel B muestra el incremento producido en la entrada de Ca^{2+} por el Bay K 8644 con respecto al valor de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ obtenido en la despolarización control para los dos tipos celulares (*) ($p < 0,05$ con respecto a control). Diferencias significativas analizadas por el test de ANOVA (panel A) y T de Student (Panel B)

5.7 Efecto de la elevación de $[Ca^{2+}]_c$ en la distribución de Bcl2 y canal L (α_{1D}) en células Control y Bcl2

Estos experimentos, realizados con Bay K 8644 sugieren un efecto de Bcl2 sobre el CCVD del subtipo L. Por esta razón quisimos esclarecer si la proteína Bcl2 podría estar colocalizada con la subunidad α_{1D} del CCVD del subtipo L o si los CCVD del subtipo L sufrían una regulación a la baja de su expresión en células Bcl2. Por este motivo decidimos hacer una inmunotinción doble para detectar y localizar Bcl2 y la subunidad α_{1D} del CCVD tipo L.

El protocolo experimental fue el siguiente: ambos tipos celulares se fijaron

- a. En situación de reposo
- b. Tras una despolarización con un alto K^+ durante 1 s
- c. Tras una despolarización con un alto K^+ durante 1 s en presencia de Bay K 8644
- d.

En reposo, situación en que la $[Ca^{2+}]_c$ es baja, en las células control se puede observar una colocalización de Bcl2 con el canal L (Figura 23.1a) evidenciada por el color amarillo que se observa en las células. En el fluorocromograma se ve la zona donde confluyen las nubes de puntos de fluorescencia roja y verde correspondientes con el canal L y Bcl2 respectivamente (Figura 23.1b). Sin embargo, en las células Bcl2 (Figura 23.1c) el punteado que se observa en las células es claramente rojo y verde. Las nubes de puntos no parecen coincidir (Figura 23.1d), indicando que Bcl2 y canal L no colocalizan. Además, en el citofluorograma se puede observar que la fluorescencia verde presenta una mayor densidad de puntos y una mayor intensidad en la fluorescencia, debida a la sobreexpresión de la proteína Bcl2 en este tipo celular. Estos datos coinciden con aquellos obtenidos en el western blot, donde podíamos detectar una banda muy intensa para Bcl2 mientras que para control la proteína era prácticamente indetectable. Además, en ambos tipos celulares la nube de puntos de fluorescencia roja alcanzó intensidades iguales, indicando así que no había diferencias en la expresión de este canal (circunstancia que también habría podido explicar la disminución de la $[Ca^{2+}]_c$ en las células Bcl2).

También quisimos ver si Bcl2 estaba sufriendo algún tipo de modificación espacial que pudiera explicar la disminución en la entrada de Ca^{2+} observada en los experimentos funcionales con ecurina. Para ello estimulamos las células con alto K^+ y las fijamos (Figura 23.2a). En esta situación, en las células control, la colocación observada en reposo disminuye al mismo tiempo que aumenta la intensidad de los puntos de fluorescencia verde. En las células Bcl2, la despolarización produce un aumento del número de puntos de fluorescencia verde y un desplazamiento de los mismos hacia valores mayores del eje de abscisas (Figura 23.2c y 23.2d respectivamente).

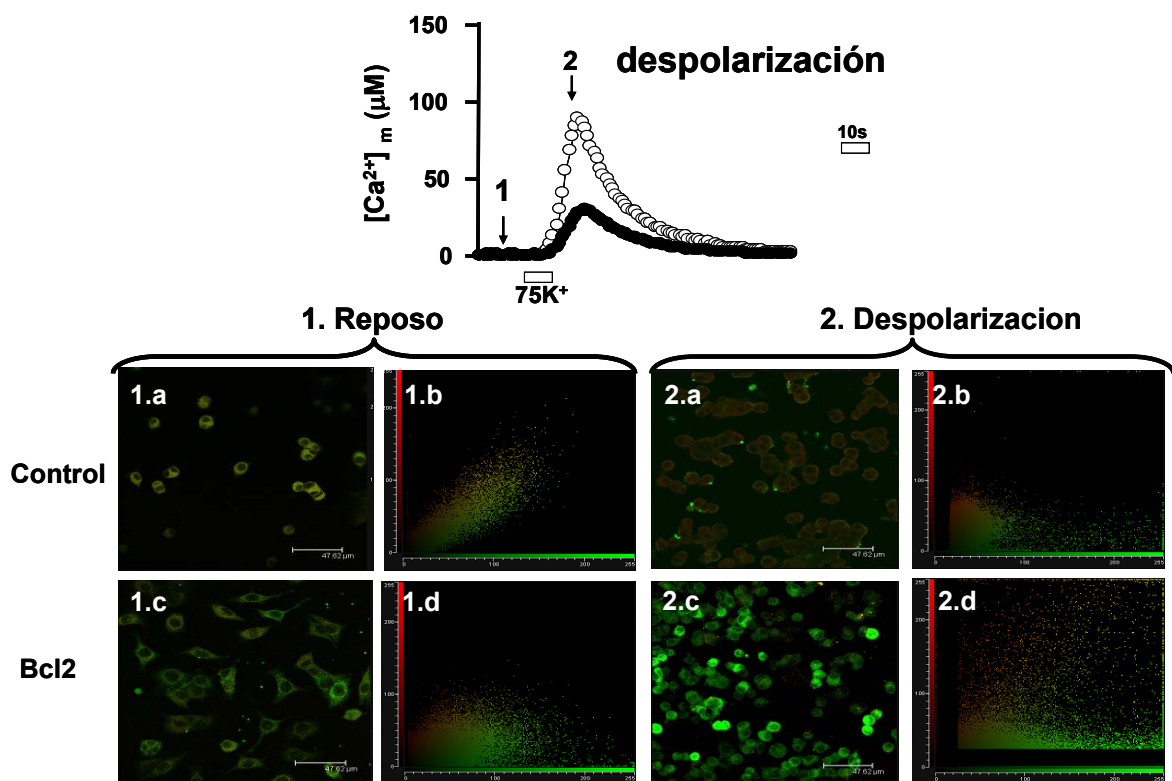


Figura 23: En el panel A se muestra un registro típico de despolarización con alto K^+ en los dos tipos celulares (Control y Bcl2) en el que se señala los puntos en que se han fijado las células. En el panel B, el panel 1A muestra la imagen confocal de Bcl2 (verde) y α_{1D} (rojo) en células Control en reposo. El panel 2A muestra la imagen confocal de Bcl2 y α_{1D} en células Bcl2 en reposo. Las imágenes 1C y 2C muestran la imagen confocal de Bcl2 y α_{1D} de células Control y Bcl2, respectivamente, en situación de despolarización. Los paneles 1B, 2B, 1D y 2D muestran los fluorocromogramas de las 4 situaciones, en los que se observa la distribución, número e intensidad de los distintos puntos de fluorescencia de las imágenes. Registro típico de 6 experimentos de 6 cultivos distintos

Al despolarizar las células en presencia de Bay K 8644 (0,3 μM) en las células control (Figura 24.2a) se producía una separación de las nubes de puntos correspondientes a la fluorescencia verde y roja al igual que ocurría al despolarizar en ausencia de Bay K 8644. En las células Bcl2 (Figura 24.2c) se observa un aumento del número de puntos de fluorescencia verde al mismo tiempo que se desplazan hacia valores de mayor intensidad a lo largo del eje de abscisas. Este desplazamiento de la nube de puntos se había observado ya en la despolarización en ausencia de Bay K 8644, pero en presencia de este agonista el efecto es más marcado (Figura 24.2d).

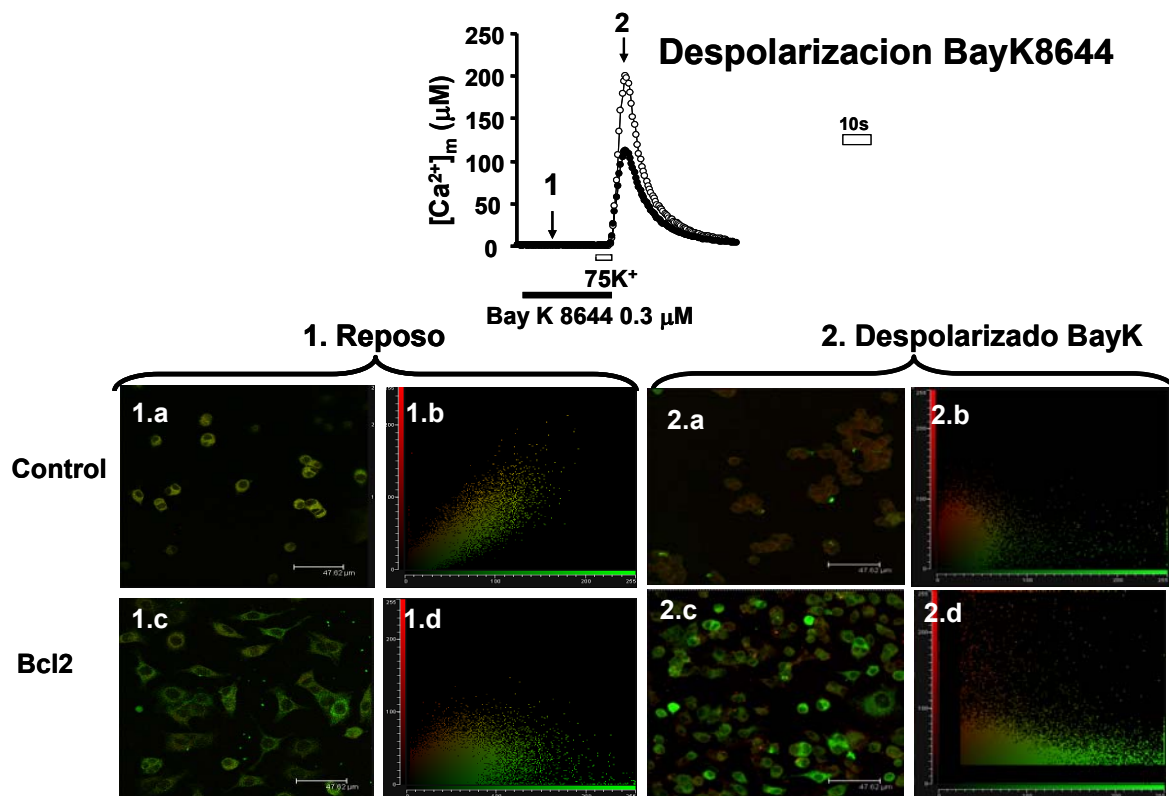


Figura 24: En el panel A se muestra un registro típico de despolarización con alto K⁺ en presencia de Bay K 8644 en los dos tipos celulares (Control y Bcl2) en el que se señala los puntos en que se han fijado las células. En el panel B, el panel 1a muestra la imagen confocal de Bcl2 (verde) y α_{1D} (rojo) en células Control en reposo. El panel 2A muestra la imagen confocal de Bcl2 y α_{1D} en células Bcl2 en reposo. Las imágenes 1C y 2C muestran la imagen confocal de Bcl2 y α_{1D} de células Control y Bcl2, respectivamente, en situación de despolarización en presencia de BayK 8644. Los paneles 1B, 2B, 1D y 2D muestran los fluorocromogramas de las 4 situaciones, en los que se observa la distribución, número e intensidad de los distintos puntos de fluorescencia de las imágenes. Registro típico de 6 experimentos de 6 cultivos distintos.

2.8 Incremento por ionomicina de la $[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_m$ en células control y Bcl2

Para comprobar la hipótesis de que Bcl2 podría estar influyendo en la apertura de canales CCVD del subtipo L utilizamos la ionomicina para elevar el Ca^{2+} citosólico sin la influencia de una despolarización, pasando por alto así el CCVD del subtipo L. En presencia de ionomicina (1 μ M, 10 s) el máximo de $[Ca^{2+}]_c$ alcanzó un valor de 0,88 μ M para las células Control (Figura 25A) y 1,53 μ M para células Bcl2 (Figura 25B). El mismo tipo de experimento realizado en poblaciones de células que expresaban Mit-mut-AEQ proporcionó unos registros típicos que mimetizaban los obtenidos con Cyt-AEQ. En este caso el máximo de $[Ca^{2+}]_m$ alcanzó un valor de 11 μ M para células Control y de 36 μ M para células Bcl2 (Figura 26 A y B respectivamente).

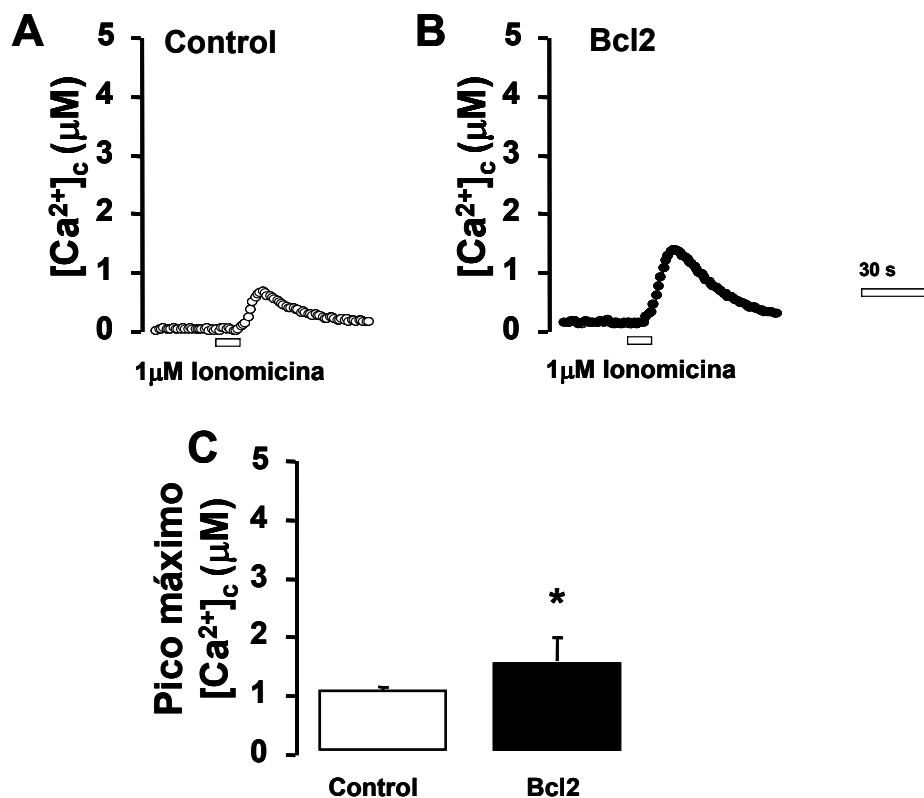


Figura 25: Registros típicos de células Control y Bcl2 transfectedas con Cyt-AEQ, que se superfundieron con una solución de Krebs-HEPES con 2 mM de Ca^{2+} para permitir que se equilibrara la basal. Después se sometieron a un pulso de 1 μ M de ionomicina de 10 s, tal como se muestra en el panel A (Control) y en panel B (Bcl2). El incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ que siguió al tratamiento con ionomicina fue mayor en las células Bcl2. El panel C muestra las medias de las amplitudes de los picos de $[Ca^{2+}]_c$ en respuesta a 1 μ M de ionomicina (n= 11 y n=21 para Control y Bcl2 respectivamente, 3 cultivos).* p> 0,01 por la T de student

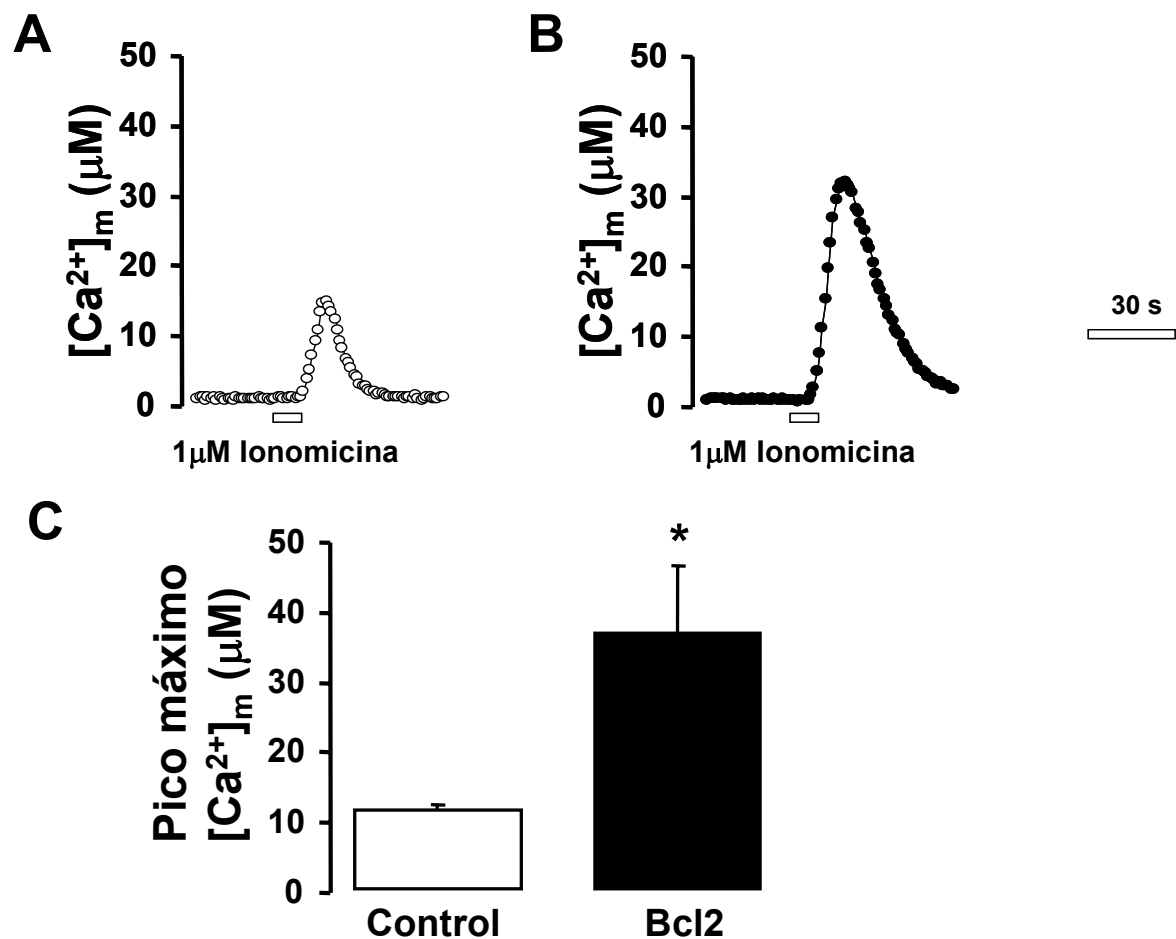


Figura 26: Registros típicos de células Control y Bcl2 transfectadas con Mit-mut-AEQ, que se superfundieron con una solución de Krebs-HEPES con 2mM de Ca^{2+} para permitir que se equilibrara la basal. Después se sometieron a un pulso de 1 μM de ionomicina de 10 s, tal como se muestra en el panel A (Control) y en panel B (Bcl2). El incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ que siguió al tratamiento con ionomicina fue mayor en las células Bcl2. El panel C muestra las medias de las amplitudes de los picos de $[Ca^{2+}]_m$ en respuesta a 1 μM de ionomicina (n= 11 y n=21 para Control y Bcl2 respectivamente, 3 cultivos). * p> 0,01 por la T de student

En este tipo de experimentos no dependientes de despolarización encontramos que las células Bcl2 se comportan como en la situación de "mitocondria in situ" (Células permeabilizadas). Es decir, cuando se estimulaba la captación de Ca^{2+} por el uniportador con una solución intracelular con $[Ca^{2+}]_i$ de 30 μM la entrada de Ca^{2+} en las células Bcl2 es mayor que en las Control. En estos resultados podemos comprobar que la captación de Ca^{2+} por parte del uniportador de Ca^{2+} se encuentra aumentada en Bcl2 con respecto al control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación que también hallaron una mayor captación de Ca^{2+} en células con sobreexpresión de Bcl2 al tratarlas con ionomicina (Gil-Parrado y col., 2002; Ichimiya y col., 1998; Reynolds y col., 1996)

2.9 Efecto de la despolarización con alto K^+ en células PC12 con expresión transitoria de Bcl2

A la hora de trabajar con clones estables hay que tener en cuenta que el clon puede desarrollar mecanismos para compensar el efecto de la proteína clonada. La inserción en el genoma del gen para la proteína de interés puede llevar a silenciar genes o llevar a la pérdida del fenotipo (Blum y col., 2000) o bien, como es el caso de la proteína Bcl2 que una sobreexpresión lleve aparejado cambios en la expresión de la maquinaria encargada de regular la homeostasia del Ca^{2+} (Kuo y col., 1998; Vanden Abeele., 2002; Liu y col., 1997; Yu y col., 1999; Mery y col., 1996).

Por este motivo realizamos experimentos sobre poblaciones de células PC12 sin modificación genética (NMG), previamente cotransfectadas de manera transitoria con Bcl2 y Mit-mut-AEQ (trans Bcl2) durante 36 h. Se las sometió a pulsos despolarizantes de alto K^+ en presencia o ausencia de Bay K 8644.

En las células control (transfectadas con un plásmido vacío) la despolarización con alto K^+ elevó la $[Ca^{2+}]_m$ a un valor de aproximadamente 70 μM (Figura 27A). Cuando dicha despolarización se realizaba en presencia de Bay K 8644 0,3 μM , la $[Ca^{2+}]_m$ alcanzó un valor de alrededor de 200 μM (Figura 27B). En las células Trans Bcl2, la despolarización provocó un incremento de $[Ca^{2+}]_m$ de alrededor de 55 μM (Figura 27C). El Bay K 8644 triplicó el valor de este máximo de $[Ca^{2+}]_m$ (Figura 27D). Al igual que se vio en los clones, la entrada de Ca^{2+} tras una despolarización está disminuida en las células Trans Bcl2 con respecto al Control. También cuando esa despolarización se realiza en presencia de Bay K 8644, éste parece hacer un efecto mayor sobre las Trans Bcl2 que sobre las Control.

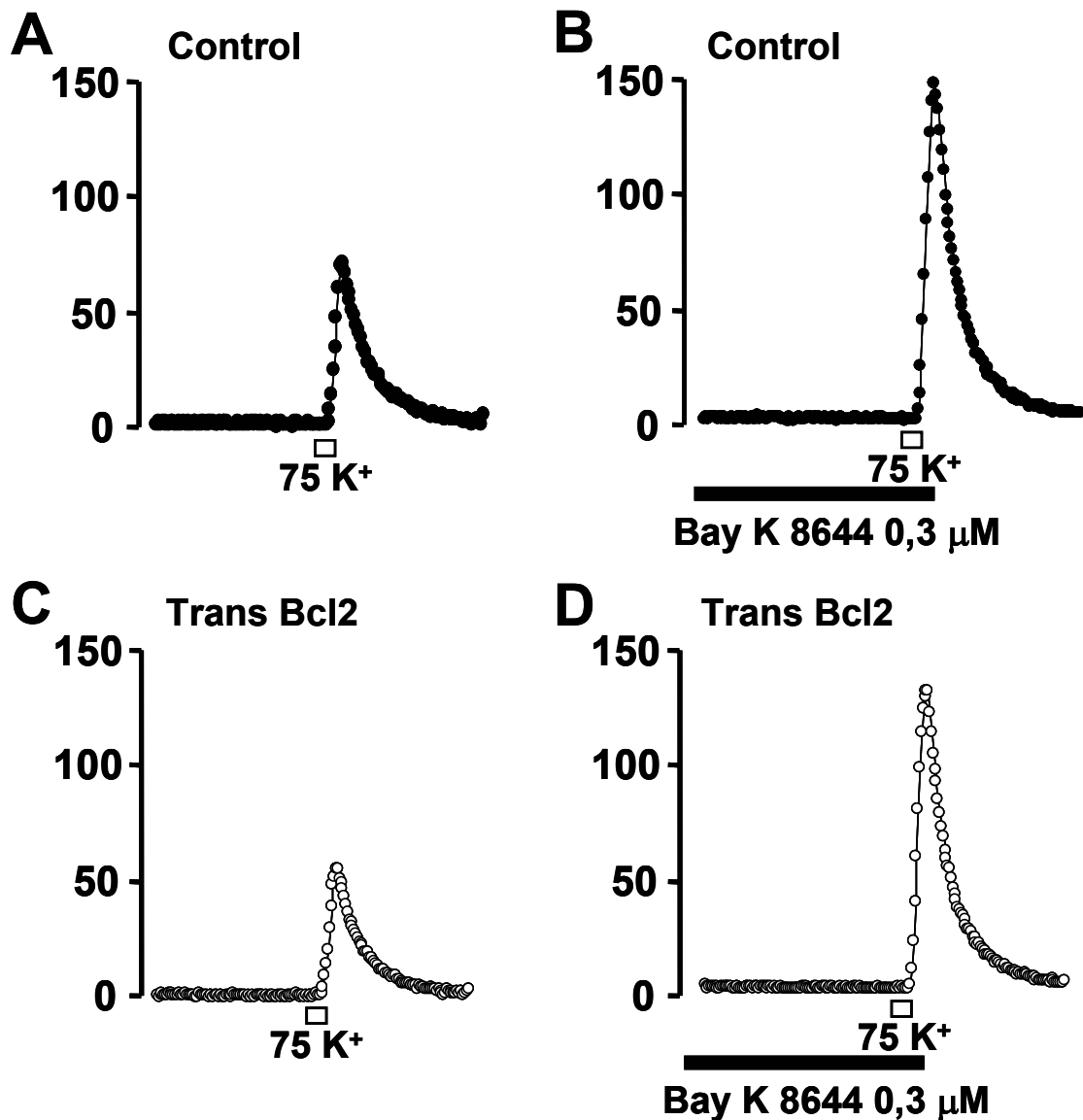


Figura 27: Células NMG se transfectaron con el cADN para cyt-AEQ y un vector vacío (Control) o con el cADN para Bcl2 y Mit-mut-AEQ (Trans Bcl2). En los paneles A y C, células Control y Trans Bcl2 se sometieron a una despolarización control de 10 s con alto K⁺ (75 mM). En los paneles B y D se realizó la misma despolarización pero en presencia de 0,3 μM BayK 8644.

5.10 Corrientes de entrada de Ca²⁺ en células control y Bcl2

Decidimos hacer una medida mas directa de la entrada de Ca²⁺ a través del CCVD del subtipo L y para ello recurrimos a la técnica de patch clamp en su configuración de célula entera

Se fijó el voltaje de la membrana a -80 mV. Una primera curva I-V proporcionó información acerca del potencial en el cual la corriente era máxima para cada célula, que estaba entre 0 y 10 mV. Después se aplicaron diez pulsos despolarizantes a estos voltajes para medir la corriente de entrada de Ca^{2+} . Para hacer mayor la amplitud de la corriente de entrada se utilizó Ba^{2+} como transportador de carga. En células Control, la corriente mostró una activación rápida, un pico máximo alrededor de 200 pA y no se inactivó (Figura 28A). En el caso de las células Bcl2 no se observó corriente de entrada de Ba^{2+} (I_{Ba}) y se observó la presencia de una corriente de salida (Figura 28B). Incluso en presencia de 50 mM de Ba^{2+} no fue posible conseguir una corriente de Ba^{2+} en las células Bcl2.

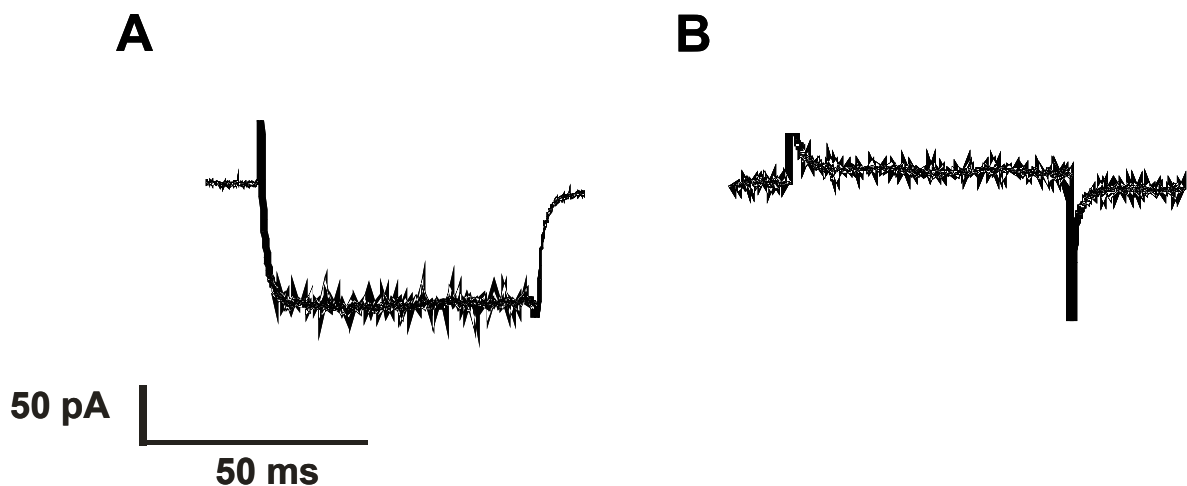


Figura 28: Corrientes de Ba^{2+} a través de CCVD del subtipo L registradas en una célula Control (panel A) y Bcl2 (panel B) en una solución extracelular estándar. En células Control (panel A) la I_{Ba} alcanza los 200 pA mientras en células Bcl2 (panel B) no solo no hay corriente de entrada sino que hay una corriente de salida.

Se procedió a realizar estos experimentos en una solución extracelular en la que se sustituyó todo el NaCl por TEA.Cl y con 5 mM de Ca^{2+} en lugar de Ba^{2+} .

En la célula control un pulso de 50 ms a 0 mV generó una I_{Ca} que alcanzó el pico máximo de amplitud alrededor de 60 pA (Figura 29A, corriente 1) y sufrió una ligera inactivación. Cuando la célula se superfundió 30 s con 1 μM Bay K 8644, la amplitud máxima se duplicó y la inactivación fue mas pronunciada (Figura 29A, corriente 2). En estas condiciones sí fue posible registrar corrientes en células Bcl2. Una despolarización control provocó una I_{Ca} que pareció activarse

más lentamente que en la célula control, alcanzó un pico máximo a 50 pA y se inactivó ligeramente (Figura 29B, corriente 1). Bay K 8644 dobló el pico de I_{Ca} (alrededor de 100 pA) y aumentó la inactivación (Figura 29B, corriente 2).

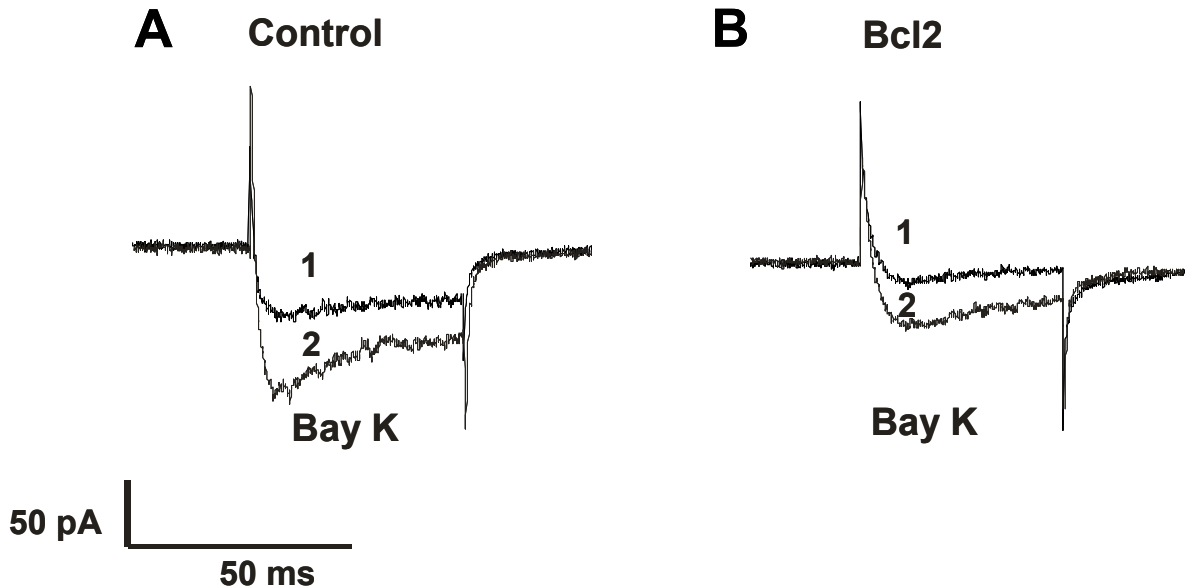


Figura 29: Los paneles A y B muestran I_{Ca} típicas de células Control (A) y Bcl2 (B). Las células se superfundieron en una solución de TEA con 10 mM de Ca^{2+} como transportador de carga. Se obtuvo una I_{Ca} de 75 pA (panel A, número 1) y de 45 pA (panel B número 1) para Control y Bcl2, respectivamente. Bay K 8644 aumentó las I_{Ca} en Control y Bcl2 (paneles A y B, número 2).

La curva I-V para células Control (Figura 30A) nos muestra que en estas células la corriente alcanzó un pico máximo de -130 pA a 20 mV, mientras que al poner BayK 8644 en la solución de perfusión la I_{Ca} aumentó hasta los -175 pA de amplitud, pico que se alcanzó a los 10 mV. La curva I-V para las células Bcl2 nos muestra que el máximo de corriente en las células Bcl2 está en 100 pA que se alcanzan a los 20 mV y al poner Bay K 8644

Así, Bay K 8644 aumentó la amplitud del pico de corriente I_{Ca} y desplazó la curva I-V hacia la izquierda alrededor de 10 mV. La superfusión con 75 mM de K^+ causó una despolarización de unos pocos milivoltios menos en Bcl2, decidimos cuantificar las corrientes de Ca^{2+} con 10 mV de diferencia en la curva I-V en control y Bcl2. Así, a 0 mV la I_{Ca} de células control alcanzó 42 pA mientras que para Bcl2 alcanzó 10 pA a -10 mV. Bay K 8644 aumentó la I_{Ca} hasta alrededor de 95 pA en células control a 0 mV y hasta 35 pA a -10 mV en células Bcl2. Esto

implica un aumento de 2.2 veces en las células control y de 3.5 veces en células Bcl2. Este mayor efecto de Bay K 8644 en las células Bcl2 concuerda con los resultados observados en los que cuantificábamos la captación de Ca^{2+} mitocondrial con Mit-mut AEQ.

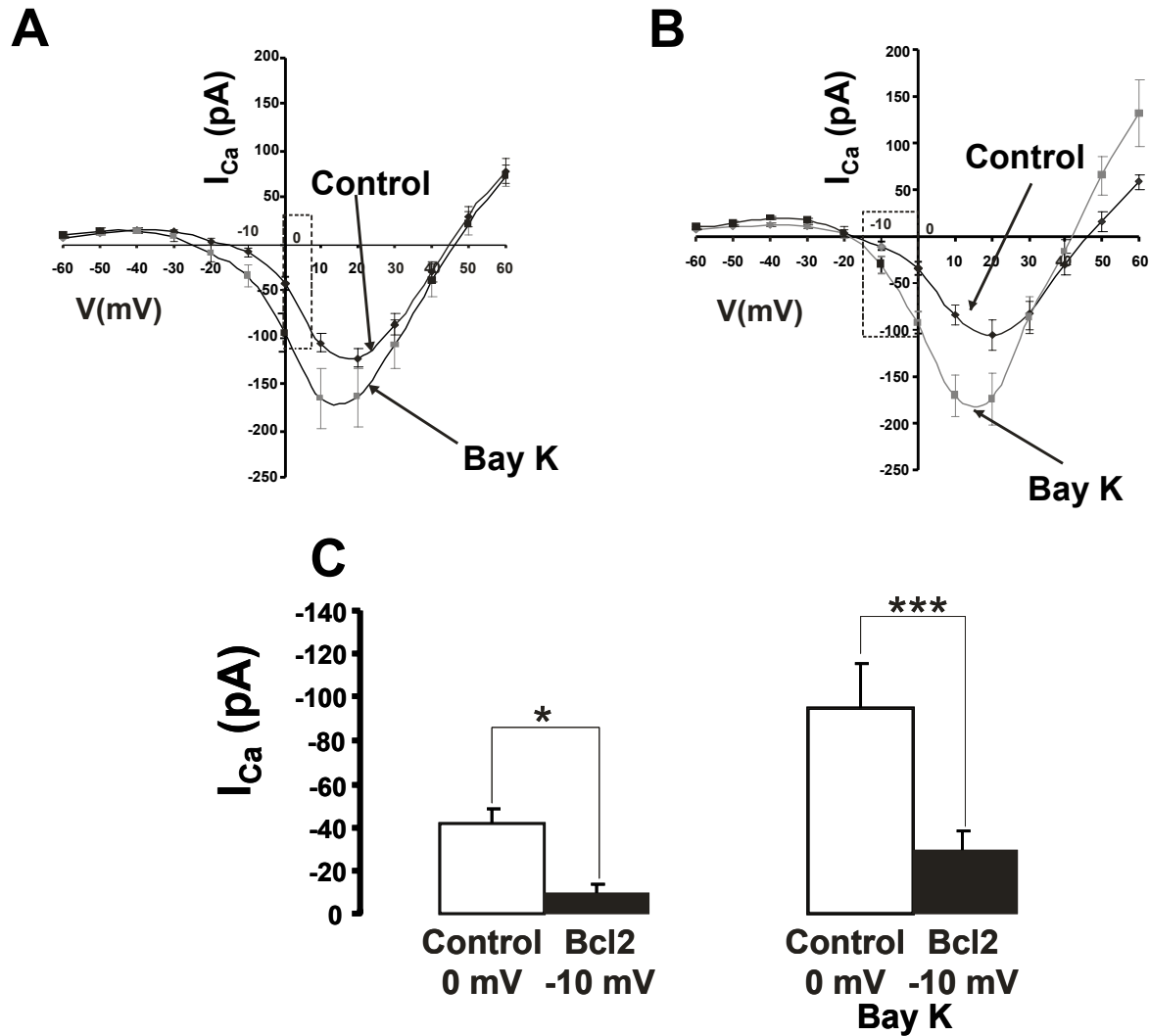


Figura 30: Los paneles A y B muestran las curvas I-V obtenidas en células Control (panel C) y Bcl2 (panel D) antes (cuadrados negros) y durante la aplicación (cuadrados grises) de una solución suplementada con 1 μM de BayK 8644. Cada punto es la media de 17 y 9 células en cada caso. El panel C muestra las diferencias entre las I_{Ca} para Control y Bcl2 a 0 mV y a -10 mV, en la presencia y ausencia de 1 μM de Bay K 8644. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ con respecto a control)

5.11 Medida del potencial de membrana en reposo y en presencia de alto K^+ extracelular en células control y Bcl2

Realizamos registros del potencial de membrana (E_m) en células control y Bcl2 utilizando una solución extracelular con 2 mM de Ca^{2+} usando la técnica de patch clamp en su configuración de parche perforado en el modo de fijación de corriente.

El potencial de membrana inicial era similar en los dos tipos de células, en un valor de -58 mV (Figura 31A). Al cambiar la solución extracelular con 75 mM de K^+ , el E_m descendió desde -58 mV hasta -4 mV en las células control y hasta -8 mV en las células Bcl2. Al cambiar de nuevo a la solución normal, baja en K^+ , el E_m volvió al valor inicial de -58 mV. El potencial de membrana inicial era similar en los dos tipos celulares. La despolarización con alto K^+ llevó el E_m a valores ligeramente más hiperpolarizados en las Bcl2 que en las Control. La diferencia entre los E_m en presencia de alto K^+ , aunque pequeña, era significativa.

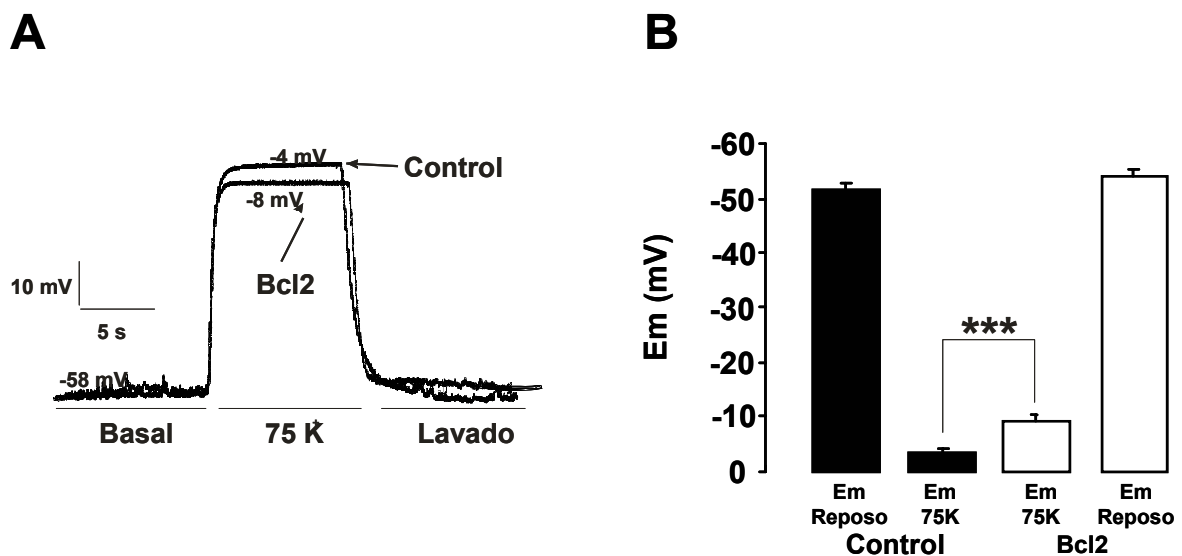


Figura 31: El E_m se registró usando la técnica de patch clamp en su configuración de parche perforado en el modo de fijación de corriente. El panel A muestra dos registros del E_m de una célula Control y una célula Bcl2 (señalados con flechas). El E_m inicial se obtuvo en una solución extracelular con 5,33 mM K^+ y 2 mM Ca^{2+} . Una solución con 75 mM K^+ (con el Na^+ reducido) se aplicó tal como se indica en la figura. El panel B muestra el E_m medio en las situaciones de reposo y de despolarización para los dos tipos celulares.

*** $p < 0,001$.

5.12 Determinación de la expresión de la proteína Bcl2 en pacientes epilépticos resistentes a la medicación antiepiléptica

Hasta ahora habíamos realizado experimentos en los clones que sobreexpresaban la proteína antiapoptótica Bcl2. Hemos encontrado que regula finamente la entrada de Ca^{2+} en las células PC12. Esto nos llevó a pensar en su posible papel regulador del Ca^{2+} y antiapoptótico en pacientes epilépticos resistentes a la medicación. Quisimos saber si estos pacientes sometidos a la cirugía de la epilepsia podían sobreexpresar dicha proteína, ya que sufren esta enfermedad durante más de 30 años sin perder aparentemente sus capacidades intelectuales y motoras, aun a sabiendas que las crisis epilépticas generan microinfartos. Estos ictus transitorios, recurrentes, podrían originar la sobreexpresión de Bcl2. Para ello, quisimos realizar una detección de la expresión de Bcl2 en muestras de tejido conservadas en un medio de criocongelación el día de la intervención. Se realizó la separación de proteínas tal como se explicó en materiales y métodos (página 37) y se determinó la presencia de Bcl2 y tubulina (como control de carga) por inmunorreactividad contra anticuerpos específicos (Figura 32). Estudiamos a pacientes con epilepsia temporal, aquellos que presentan con mayor frecuencia resistencia a fármacos y que suelen presentar peor pronóstico

Disponíamos de tres tipos de muestras distintas:

- a. Corteza no epileptógena, tejido del borde de la zona reseccionada que no muestra actividad epileptógena
- b. Corteza epileptógena
- c. Hipocampo epileptógeno

Como se puede observar en la figura 22, algunos de los pacientes sometidos a cirugía presentan sobreexpresión de Bcl2. Estos casos son los pacientes 250, 251 y 254 como se muestran en la figura remarcados en rojo.

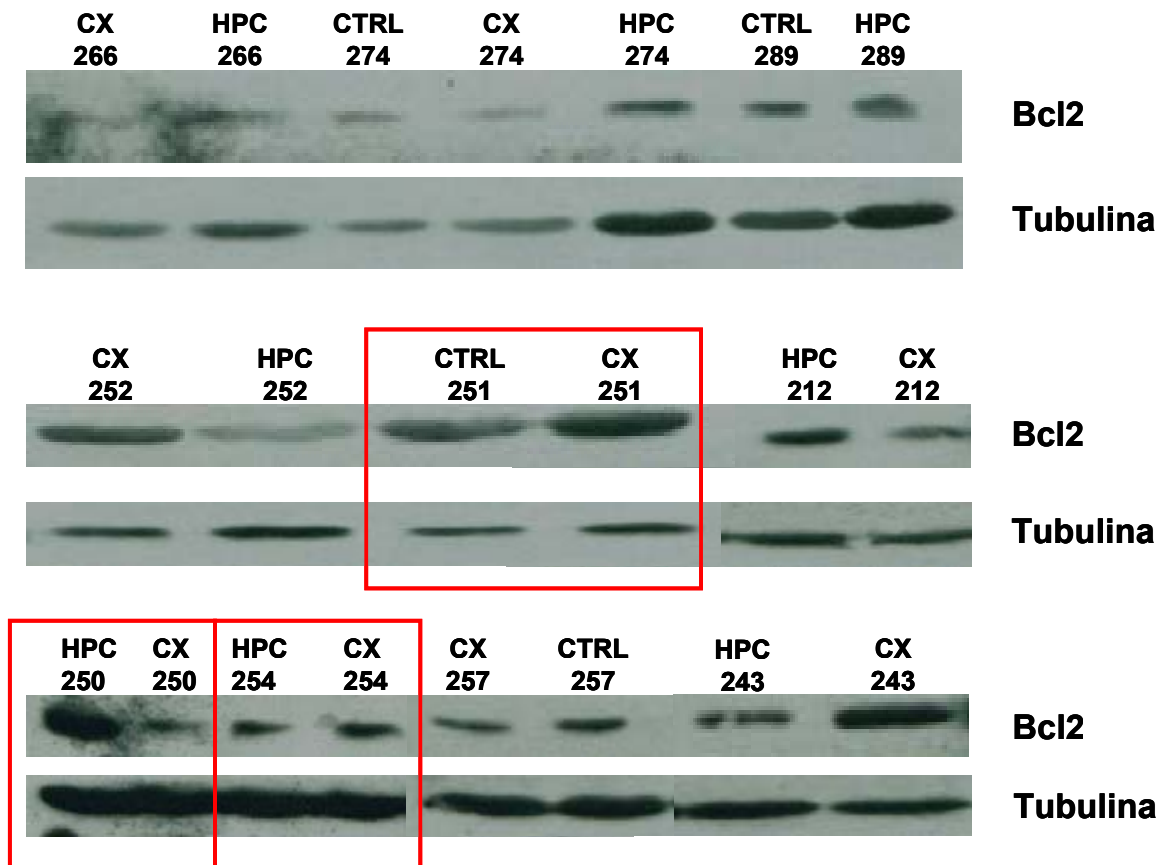


Figura 32: Para cada paciente determinamos por western blot la expresión de Bcl2. Las muestras se identificaron como CTRL (corteza no epileptogénica) CX (corteza epileptogénica) y HPC (hipocampo epileptogénico)

Realizamos un análisis densitométrico de las bandas considerando como expresión basal de Bcl2 la media de la relación Bcl2/tubulina de cada uno de los controles y comparamos con este parámetro la media de la relación Bcl2/tubulina de las muestras de corteza e hipocampo. Encontramos que, aunque las diferencias no eran significativas, el nivel de expresión en la corteza casi triplicaba el valor de Bcl2 en la corteza no epileptógena y que en el hipocampo el nivel de expresión de Bcl2 casi sextuplicaba aquel encontrado en la corteza no epileptógena (Figura 33, panel A).

Al hacer un estudio de los niveles de expresión de Bcl2 en muestras de hipocampo paciente a paciente, enfrentando este valor al tiempo de evolución de la enfermedad, encontramos que los niveles de Bcl2 en hipocampo eran mayores en aquellos pacientes que presentaban un tiempo de evolución de la

enfermedad entre 14 y 16 años. Por debajo o por encima de este tiempo los niveles de expresión de Bcl2 aparecen bajos, próximos al control (Figura 33B).

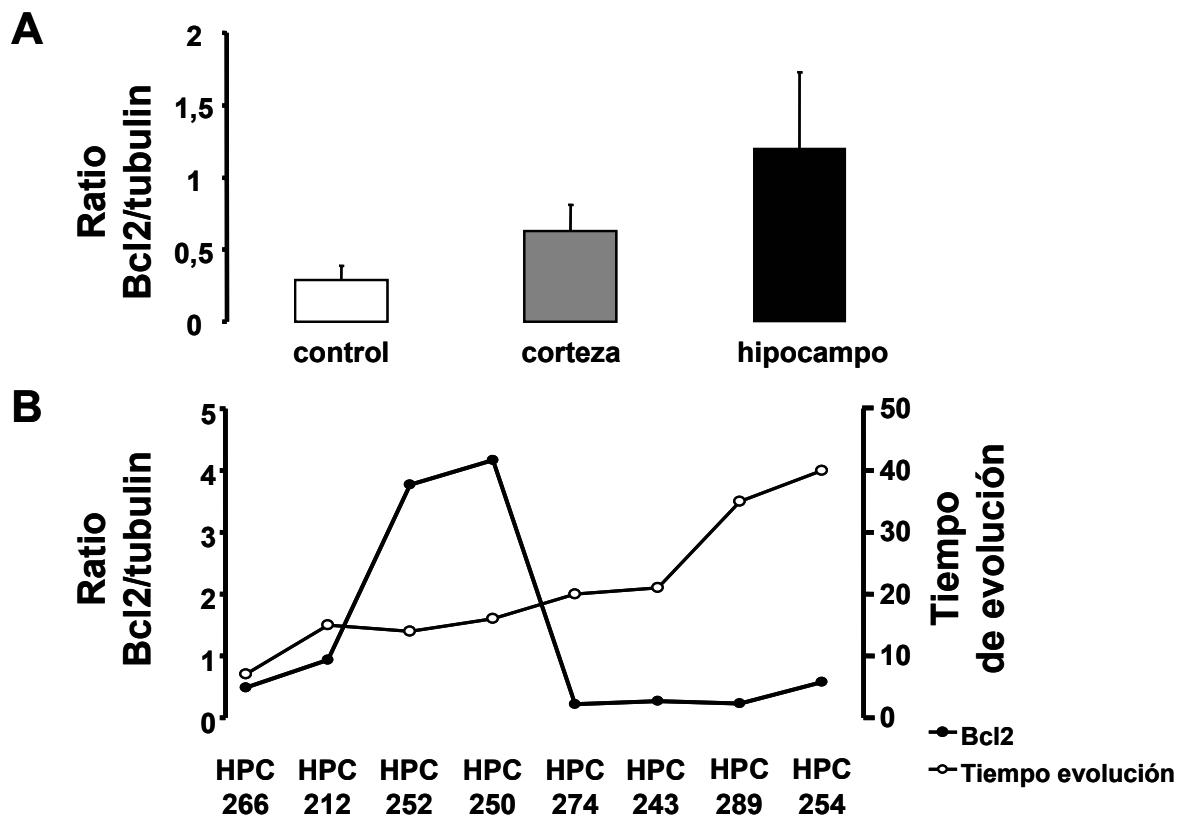


Figura 33: En el panel A se muestran los valores medios de la relación Bcl2/Tubulina de los controles, cortezas e hipocampos. En el panel B se muestra la relación entre los valores de la relación Bcl2/tubulina de cada uno de los hipocampos frente al tiempo de evolución de la enfermedad de cada uno de los pacientes.

6. Discusión

6.1 Línea celular PC12 y clones estables de Bcl2

En la presente tesis doctoral nos interesamos por conocer la forma en la que una proteína anti-apoptótica como la Bcl2 podría interferir con la homeostasia del Ca^{2+} y así ejercer, entre otros, su efecto anti-apoptótico.

Para ello decidimos utilizar células excitables tipo PC12. La línea celular PC12 procede de un feocromocitoma de rata (Greene y col., 1976), expresa CCVD de los subtipos L (68%) y N (32%) (Usowicz y col., 1990). Con estas características las células PC12 constituyen un buen modelo experimental a la hora de esclarecer posibles mecanismos de muerte celular o supervivencia, mediados por estímulos despolarizantes, entre otros (Cano-Abad y col., 2001).

Además disponíamos en el laboratorio de dos clones estables que expresaban nuestra proteína diana, Bcl2, y su correspondiente control. Antes de comenzar los experimentos con dichos clones hicimos los controles pertinentes para establecer:

A) Los clones de PC12 conservaban el fenotipo neuronal nativo de las PC12. Según está descrito por Blum y col. (2000) esta línea podría tener ciertas limitaciones. Estos autores advierten que a la hora de interpretar los resultados obtenidos con un clon estable de Bcl2 ha de tenerse cierta precaución. Trabajando con clones de células PC12 que sobreexpresaban Bcl2 encontraron que uno de los clones había perdido el fenotipo neuronal. El clon que había perdido el fenotipo era resistente a estímulos de muerte como los otros clones que utilizaba este grupo en ese trabajo. Sin embargo, al estudiar su fenotipo, observaron que no respondían al tratamiento con NGF ni mostraban actividad tirosina hidroxilasa, dos características típicas de las PC12 originales. También observaron un cambio en la morfología celular (Blum y col., 2000). Para comprobar que ésta no era la situación de nuestros clones y que conservaban las propiedades originales de las células PC12, los sometimos a tratamiento con 50 ng/ml de NGF y encontramos que las células Control y Bcl2 se diferenciaban

de la misma manera (datos no mostrados). Ambos clones conservaban la morfología característica de la línea celular (Figura 7, Materiales Y Métodos).

B) Comprobar la expresión estable de Bcl2. Mediante la técnica de western blot comprobamos que las células no habían perdido la expresión de Bcl2. Encontramos que las células Control no tenían niveles detectables de Bcl2 y que las células Bcl2 presentaban niveles de Bcl2 significativamente mayores con respecto a su control (Figura 1). Encontramos también que la cotransfección de Bcl2 y Cit-AEQ llevaba a una sobreexpresión de Bcl2 de menor intensidad que la observada en los clones. Dicha expresión se realizó también cotransfectando con Mit-mut-AEQ y se obtuvieron los mismos resultados (Datos no mostrados).

C) La transfección transitoria de Bcl2 en células PC12 nativas conservaba el patrón regulador de Bcl2 sobre la homeostasia del Ca^{2+} . Una transfección transitoria de Bcl2 junto con Mit-mut-AEQ en células NMG nos proporcionó unos resultados similares a los que obtuvimos en los clones (Figura 27). Estas circunstancias demuestran que nuestros clones no habían perdido el fenotipo característico de las células PC12 y por tanto, que seguían siendo válidos como modelo neuronal; además, todos los efectos observados se debían a la proteína Bcl2, tal como ocurre en otros trabajos realizados en clones estables de Bcl2 (Foyouzi-Youssefi y col., 2000; Vanden Abeele y col., 2002, Breckenridge y col., 2003, Palmer y col., 2004; Pinton y col., 2000; Basset y col., 2006)

6.2 Efecto de Bcl2 sobre el Ca^{2+} citosólico, mitocondrial y reticular

Con el fin de esclarecer el mecanismo regulador sobre la homeostasia del Ca^{2+} de la proteína Bcl2, la primera aproximación experimental que llevamos a cabo fue la de transfectar las células Control y Bcl2 con los plasmidos que codifican para Cit-AEQ y Mit-mut-AEQ. Utilizamos como estímulos una solución de alto K^+ (75 mM) y otra con 20 mM de cafeína. Con la primera pretendíamos despolarizar

las células y así monitorizar los niveles citosólicos y mitocondriales de Ca^{2+} . Con la segunda exploramos de forma indirecta el estado de llenado del RE y como las mitocondrias tamponaban la salida de Ca^{2+} proveniente del RE

La primera observación de este trabajo es la gran disminución del Ca^{2+} citosólico en las células Bcl2 con respecto a las Control.

Los resultados de los experimentos en Cit-AEQ en respuesta a una despolarización nos mostraron que el Ca^{2+} citosólico estaba drásticamente disminuido en las células Bcl2, con respecto a las células Control (Figura 11, paneles A y B).

Estos datos de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ están en línea con las observaciones de otros autores, donde ven una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en distintos tipos celulares (Foyouzi-Youssefi., 2000; Pinton y col., 2000; Palmer y col., 2004). Sin embargo, los modelos utilizados por estos autores son células no excitables: línea A20 de células de linfoma, HeLa y células epiteliales de cáncer de mama (Foyouzi-Youssefi., 2000; Pinton y col., 2000; Palmer y col., 2004 respectivamente). Luego nuestro modelo celular introduce una nueva variable, los CCVD en el caso de la despolarización con alto K^+ .

En el caso del Ca^{2+} procedente del RE, exploramos la salida de Ca^{2+} mediante un agonista del receptor de rianodina, la cafeína. Encontramos que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ evocado por un estímulo de 10 s de cafeína 20 mM se encontraba disminuido en un 70% con respecto al incremento evocado por un estímulo similar en las células Control (Figura 13).

En este sentido existe una amplia literatura en donde se esclarece el posible mecanismo regulador de Bcl2 sobre el Ca^{2+} de RE (Pinton y col., 2000; Foyouzi-Youssefi y col., 2000; Vanden Abeele y col., 2002, Breckenridge y col., 2003, Palmer y col., 2004). Nosotros observamos la misma tendencia, un RE disminuido en $[\text{Ca}^{2+}]$ en las células Bcl2 con respecto a las Control.

En el caso de las mitocondrias encontramos que un estímulo despolarizante con alto K^+ , la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ era menor en un 75% con respecto a las Control (Figura 12). Una vez más, estos datos están en consonancia con la literatura (Pinton y col., 2000; Basset y col., 2006). En estos trabajos, los autores muestran una $[\text{Ca}^{2+}]_m$

reducida en respuesta a distintos estímulos como carbacol y ATP y una vez más en células no excitables.

6.3 Efecto de Bcl2 sobre la captación mitocondrial de Ca^{2+}

La disminución que observamos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ podríamos explicarla si las mitocondrias estuvieran próximas al canal de subtipo L. En esta situación, las mitocondrias captarían el Ca^{2+} en las proximidades de la boca del canal, como ocurre en las células cromafines bovinas (Montero y col., 2000), de forma que éste no se distribuiría por el citosol sino que entraría directamente a las mitocondrias. Pero, a su vez, la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en Bcl2, tras un estímulo despolarizante, estaba disminuida.

Por ello exploramos directamente la mitocondria, para esclarecer cual era su contribución real a la hora de tamponar el Ca^{2+} . Para ello, utilizamos la aproximación que llamamos de "mitocondria in situ" (Montero y col., 2002, 2004) que consiste en permeabilizar las células durante 30 s con digitonina y perfundirlas con una solución intracelular con concentraciones crecientes y conocidas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para estudiar la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias, sin intervención de las fuentes de Ca^{2+} de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico.

Encontramos que a bajas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (5 y 10 μM), en las mitocondrias de las células Bcl2 existía una tendencia hacia una mayor captación de Ca^{2+} , en comparación con las mitocondrias de células Control (Figura 14). Al utilizar una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 30 μM , próxima a 43 μM que es la K_m del uniportador de Ca^{2+} , encontramos que las mitocondrias de células Bcl2 captan 2,6 veces más Ca^{2+} que las de células Control (Figura 15; Figura 16, panel A). Estos resultados están en línea con los obtenidos por Murphy y col. (1996) en neuronas hipotalámicas inmortalizadas, en las que la captación mitocondrial está aumentada con la sobreexpresión de Bcl2. No solo eso, sino que al hacer un estudio de las constantes de tiempo para la captación y liberación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria, encontramos que las células Bcl2 lo liberaban al citosol 1,5 veces más rápido que las de células

Control (figura 16, panel B). No encontramos diferencias significativas en cuanto a la velocidad de captación. Al utilizar una concentración mucho mayor que la K_m del uniportador (Figura 17) es posible que hayamos saturado la capacidad transportadora de Ca^{2+} de la mitocondria y quizá por eso, la diferencia significativa encontrada con 30 μM de $[Ca^{2+}]_i$ se disipa (Figura 18).

Estos resultados nos indicaban que la mitocondria podría ser la responsable de las diferencias que encontramos en las $[Ca^{2+}]_c$ observadas en los clones. En base a este resultado pensamos que, anulando la capacidad tamponadora de la mitocondria, deberíamos eliminar las diferencias entre los clones. Los resultados obtenidos con esta aproximación mostraron que en las células Control una despolarización en presencia de FCCP provocaba un mayor aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ que cuando dicha despolarización se realizaba con la mitocondria funcional (Figura 19). Sin embargo, al realizar este tratamiento sobre las células Bcl2 no se encontraron diferencias entre las dos situaciones. Es decir, el hecho de que la mitocondria esté o no funcional no afectaba a la magnitud del pico citosólico de Ca^{2+} .

El hecho que la mitocondria capta el Ca^{2+} mas eficazmente en las células Bcl2 que en las control, junto con el hecho de que la abolición de la vía de captación mitocondrial de Ca^{2+} no provocó un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ en células Bcl2, nos llevaron a pensar en la existencia de una diana en la membrana plasmática para Bcl2, a través de la cual estaría impidiendo la entrada de dicho ión al citosol.

6.4 Efecto de Bcl2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los CCVD de la membrana plasmática

Las células PC12 presentan en su membrana plasmática de forma mayoritaria el CCVD del subtipo L (Usowicz y col., 1990) de forma que manipulamos farmacológicamente dichos canales con un agonista específico como es el Bay K 8644 (García y col., 1984) y con un bloqueante selectivo, el nimodipino, para

estudiar los posibles efectos de Bcl2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los CCVD del subtipo L.

Comprobamos que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ evocado por una despolarización en presencia del agonista, en células Control, fue 1,5 veces mayor que aquel evocado por una despolarización realizada sin manipulación farmacológica (Figura 21). En el caso de las células Bcl2, el efecto causado por el agonista Bay K 8644 casi quintuplicó la respuesta mitocondrial con respecto a la despolarización control (Figura 22). El efecto potenciador del BayK 8644 fue mucho mayor en las células Bcl2 que en las Control.

Estos resultados nos hicieron pensar en una disminución de la expresión del canal de subtipo L, que podría explicar también la disminución de los transientes citosólicos y mitocondriales de Ca^{2+} . Existen algunos trabajos que asocian a la sobreexpresión de Bcl2 una regulación al alza o a la baja de algunas proteínas de la maquinaria reguladora de la homeostasia del Ca^{2+} de la célula (Kuo y col., 1998; Vanden Abeele., 2002; Liu y col., 1997; Yu y col., 1999; Mery y col., 1996).

Por ello, realizamos una inmunotinción doble de la proteína Bcl2 y de la subunidad α_{1D} del CCVD del subtipo L. El revelado de la subunidad α_{1D} se realizó con un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo rojo y el de Bcl2 con un fluoróforo verde. Las fluorescencias roja y verde nos indican la cantidad y distribución de los canales del tipo L y Bcl2 respectivamente.

En los fluorocromogramas de Control y Bcl2 en reposo, observamos que no existían diferencias en la distribución, número e intensidad de los puntos de fluorescencia roja, lo que indicaba que no había diferencias en la cantidad y distribución del canal de subtipo L entre los dos tipos celulares. Por tanto, las diferencias que observamos en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ y $[\text{Ca}^{2+}]_c$ no vienen causadas por una disminución en la densidad de canales de Ca^{2+} asociada a la sobreexpresión de Bcl2.

Al observar la fluorescencia verde, correspondiente con Bcl2, en reposo encontrábamos que la nube de puntos de fluorescencia verde era mayor para Bcl2, mientras que en las células Control apenas había una expresión basal de dicha proteína. Este resultado coincide con lo observado en el western blot. En la situación de reposo, en células Control, vimos que las nubes de puntos de fluorescencia roja y verde se superponían, lo que nos sugiere una distribución similar del canal L con Bcl2. Esta superposición de las nubes es menos marcada en las células Bcl2.

Cuando realizamos una despolarización previa a la fijación de las células, en las células Bcl2 observamos un cambio en la nube de puntos correspondiente con la fluorescencia verde. Ante una entrada masiva de Ca^{2+} , la nube de puntos de fluorescencia verde se alarga y se hace más densa, es decir, existía un aumento del número de puntos de fluorescencia y éstos presentaban unos valores de intensidad mayores que los encontrados en las células en reposo. En esta situación, en las células Control observamos una separación de las nubes de puntos de fluorescencia verde y roja. Estos resultados nos sugerían que la colocalización que se observaba en reposo disminuiría al activarse los canales.

En el caso de una despolarización en presencia de Bay K 8644, observamos los mismos fenómenos, solo que en las células Bcl2 el aumento en la densidad de la nube de puntos y sus valores de intensidad, aumentaba de forma significativa con respecto a la situación de despolarización.

El mayor revelado de Bcl2 en situaciones en las que se incrementa el Ca^{2+} , ya sea citosólico o mitocondrial, inducido por una entrada de Ca^{2+} a través de los CCVD, nos hizo pensar en un efecto de Bcl2 a nivel de la membrana plasmática. Es decir, en una situación de reposo, la Bcl2 se encuentra anclada a la membrana plasmática en su configuración cerrada (Figura 34A). Mientras que tras un estímulo, ésta adopta la configuración de canal (abierto) insertando en la membrana plasmática los dominios transmembrana 5 y 6 (Schendel y col., 1998) (Figura 34B).

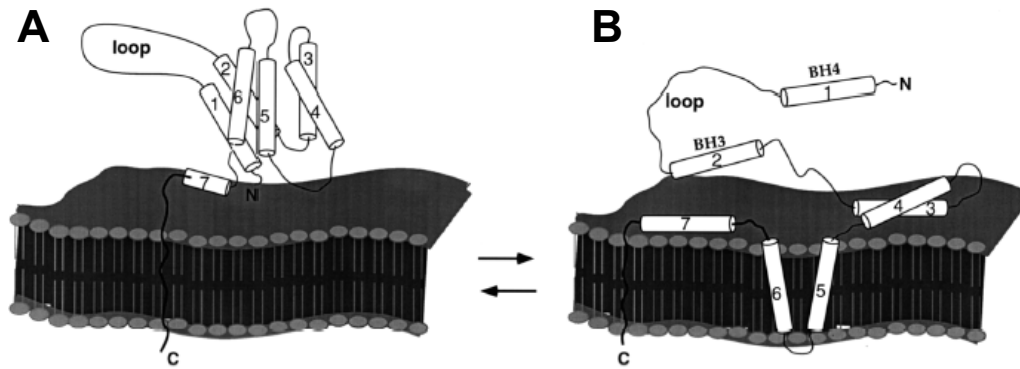


Figura 34: Representación esquemática del cambio conformacional sufrido por Bcl2. A la izquierda de la figura se muestra la configuración cerrada de la proteína en reposo y la apertura que sufre al activarse, que lleva a la inserción de las α -hélices 5 y 6 en la membrana. Adaptado de Schendel y col., 1998.

En la configuración abierta, las α hélices 5 y 6 se insertan en la membrana, al mismo tiempo que los dominios BH3 y BH4 sufren un cambio conformacional que permite su interacción con los dominios homólogos de otra proteína de la familia (Schendel y col., 1998). En su configuración de "canal" (Figura 1B) le permitiría conducir cationes monovalentes a su través (Schendel y col., 1997; Minn y col., 1997). Esta cualidad le permitiría a Bcl2, en nuestro modelo celular, manipular el potencial de membrana de reposo o de activación. Este mecanismo no está activo constitutivamente, sino que se activa ante un insulto tóxico como la entrada masiva de Ca^{2+} .

Decidimos probar si ante cualquier tipo de estímulo la Bcl2 estaría impidiendo la entrada de Ca^{2+} , o bien si era un fenómeno asociado a cambios en el potencial de membrana. Para ello, estimulamos las células con ionomicina ($1 \mu\text{M}$), estímulo independiente de la despolarización (Figuras 25 y 26). En estas condiciones encontramos, tal como describen otros autores (Gil-Parrado y col., 2002; Ichimiya y col., 1998; Reynolds y col., 1996), que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en respuesta a ionomicina se encontraba aumentada en las células Bcl2, con respecto a Control (1,7 veces). Esta mayor entrada de Ca^{2+} se vio reflejada también al estudiar la respuesta de la mitocondria frente al mismo estímulo (la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ aumentó 1,8 veces en células Bcl2 con respecto a las Control). Podemos comprobar que

Bcl2 no parece mitigar la entrada de Ca^{2+} evocada por un estímulo no fisiológico, como es la acción de un ionóforo y que, por tanto, su efecto se asocia con la entrada de Ca^{2+} evocada por una despolarización de la membrana plasmática.

Con el fin de demostrar que la Bcl2 incide sobre la conductividad de la membrana plasmática, procedimos a estudiar las corrientes de Ca^{2+} en célula única, con la técnica de patch clamp en su configuración de célula entera. En primer lugar se realizó una cuantificación de las corrientes a través de CCVD del subtipo L utilizando Ba^{2+} como portador de carga a la concentración de 10 mM. En el interior de la pipeta teníamos una solución con Cs^+ y TEA (Ardiles y col., 2006). En estas condiciones, la I_{Ba} en células Control llegó a 100 pA y no se inactivó (Figura 28 panel A), mientras que en Bcl2 no se logró una corriente de entrada de Ba^{2+} ni siquiera cuando en la pipeta se ponía una concentración de 50 mM de Ba^{2+} (Figura 28 panel B). Pero no solo no se conseguía observar una corriente de entrada sino que además observábamos una corriente de fuga de cationes, probablemente Cs^+ , que es el mayoritario en las soluciones utilizadas en esta aproximación experimental.

En vista de estos resultados, y con el fin de registrar corrientes de Ca^{2+} , forzamos las condiciones sustituyendo todo el Na^+ por TEA y utilizando Ca^{2+} como portador de carga a la concentración de 5 mM. En estas condiciones, el máximo de corriente de Ca^{2+} fue de 50 pA para Control (Figura 29, panel A, trazo 1) y 15 pA para Bcl2 (Figura 29, panel B, trazo 1), es decir, la corriente fue unas tres veces mayor para Control que para Bcl2. Al registrar las corrientes en presencia de BayK 8644 encontramos que la corriente en Control alcanzó un valor de 125 pA; por tanto, el Bay K 8644 duplicó la amplitud de la corriente en Control (Figura 29, panel A, trazo 2). En presencia de BayK 8644 la corriente de Ca^{2+} en Bcl2 alcanzó un valor de cerca de 50 pA (Figura 29, panel B, trazo 2), lo que significa que el Bay K 8644 cuadruplica la amplitud de la corriente en las células Bcl2, lo que está de acuerdo con los resultados de medida de transientes de calcio.

Un estudio de la curva I-V no mostró diferencias significativas, en cuanto a los canales de Ca^{2+} , entre los dos tipos celulares (Figura 30). Hicimos un estudio del potencial de membrana con la técnica de patch clamp en la configuración de parche perforado y fijación de corriente. La primera observación que hallamos fue que el potencial de membrana en reposo no se veía afectado por la sobreexpresión de Bcl2 en nuestro modelo celular. Al perfundir las células con una solución rica en K^+ , para provocar así la apertura de canales de Ca^{2+} , encontramos que en las células Bcl2 el salto de potencial de membrana era menor que en las células Control, es decir, la célula Bcl2 quedaba ligeramente más hiperpolarizada que la célula Control (Figura 31). Puesto que el potencial de membrana, en la situación de despolarización, era menor en las células Bcl2, esto implicaría un menor reclutamiento de CCVD del subtipo L y explicaría la menor entrada de Ca^{2+} observada en las células Bcl2, tanto en poblaciones como en célula única.

Dado que la despolarización es ligeramente menor en las células Bcl2 comparamos los valores de las corrientes en la curva I-V a 0 mV para Control y -10 mV para Bcl2. En esta situación sí encontramos una diferencia significativa en las corrientes entre los dos tipos celulares, tal como habíamos visto en los registros típicos de corrientes (Figura 30C).

En vista de estos resultados, podemos concluir que la proteína anti-apoptótica Bcl2 se inserta en la membrana plasmática y en situaciones de cambios de potencial de la membrana, la Bcl2 mitiga la extensión de la despolarización, llevando el potencial a niveles más hiperpolarizados. Se activan así menos CCVD y se evita la sobrecarga de Ca^{2+} .

6.5 Implicación clínica de la Expresión de Bcl2 en pacientes epilépticos

Luego si la Bcl2 interviene protegiendo frente a una despolarización, en determinadas patologías crónicas, como por ejemplo la epilepsia, la proteína

excesiva podría ejercer un papel regulador (Henshall y Simon., 2005). En otras palabras, en la epilepsia, la crisis epiléptica no es más que un disparo incontrolado de un grupo de neuronas que evocan despolarizaciones aberrantes. En esta situación, existe un grupo de pacientes epilépticos que sufren resistencia a la medicación antiepiléptica. Lo que implica que sufren crisis epilépticas con una alta frecuencia y durante años. La solución a esta enfermedad pasa por extirpar el foco epiléptico. En colaboración con el Servicio de Neurocirugía, tenemos acceso a este tipo de muestras y en concreto nos hemos centrado en la epilepsia del lóbulo temporal. Es en estas muestras donde hemos intentado determinar si existe una expresión de Bcl2.

Para ello determinamos la expresión de Bcl2 en extractos de proteína obtenidos desde muestras de tejido de pacientes epilépticos, mediante la técnica de western blot.

Encontramos que había una mayor expresión de Bcl2 en el hipocampo epileptógeno que en la corteza epileptógena, o que en la corteza no epileptógena que nos servía como control. En el hipocampo es donde se encuentra la lesión que genera la epilepsia temporal; por tanto es lógico que sea en ese tejido, donde se encuentran las neuronas que más sufren, donde se observe una mayor expresión de Bcl2

Nuestros resultados están en línea con los obtenidos por Henshall y col. (2000) en tejido cerebral de pacientes con epilepsia temporal, en los que se demostraba un aumento significativo de los niveles de Bcl2 en las muestras de pacientes con respecto a controles sin epilepsia. Henshall y col sugieren en este trabajo un posible papel en el desarrollo de procesos neuropatológicos en la epilepsia humana para la proteína Bcl2.

En base a esto, hicimos un estudio en los distintos pacientes de los niveles de expresión individuales de Bcl2 en el hipocampo, frente al tiempo de evolución de la enfermedad en cada uno de esos pacientes. Encontramos que los pacientes que tenían mayores niveles de Bcl2 eran aquellos que presentaban una evolución de la enfermedad de entre 14 y 16 años, mientras que los pacientes

con menor evolución en el tiempo, o mayor evolución temporal presentaban niveles de Bcl2 próximos a los controles (corteza no epileptógena).

DE ahí que pensemos que la Bcl2, en este tipo de pacientes, se expresa como consecuencia de las crisis epilépticas recurrentes, sobre todo en el hipocampo, zona donde se inicia la crisis y donde se pueden estar produciendo microinfartos. La expresión de Bcl2 podría estar evitando de alguna manera la propagación de una señal de Ca^{2+} pro-apoptótica en esta zona del tejido.

7. Conclusiones

De los resultados presentados en esta memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Bcl2 disminuye los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_m$ provocados por una despolarización con alto K^+
- Bcl2 aumenta la capacidad mitocondrial de tamponar Ca^{2+} y la velocidad de aclaramiento de este incremento de Ca^{2+} .
- En células que sobreexpresan Bcl2 el efecto potenciador del agonista de canal de subtipo L Bay K 8644 es 4 veces mayor con respecto a las control.
- Bcl2 modifica el potencial de membrana plasmática a la baja en la situación de despolarización en las células Bcl2. Esta influencia sobre el potencial de membrana explica la menor intensidad de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_m$
- La proteína Bcl2 se encuentra aumentada en las muestras quirúrgicas de hipocampo de pacientes de epilepsia resistentes a la medicación antiepiléptica con respecto al tejido control y este incremento parece que se correlaciona con una evolución de la enfermedad de entre 14-16 años

8. Bibliografía

- Alés E, Gabilan NH, Cano-Abad MF, García AG, Lopez MG. The sea anemone toxin Bc2 induces continuous or transient exocytosis, in the presence of sustained levels of high cytosolic Ca^{2+} in chromaffin cells. *J Biol Chem*. 2000 Dec 1; 275 (48): 37488-95.
- Alberts, B Johnson A Lewis J Raff M Roberts K Walter P "Energy conversion: mitochondria and chloroplasts" de "*Molecular Biology of the Cell*" 4ª edition Garland Science 2002 767-829.
- Alvarez J, Montero M, García-Sancho J. Subcellular Ca^{2+} dynamics, *News Physiol Sci*. 1999 Aug;14:161-168.
- Ardiles AO, Maripillan J, Lagos VL, Toro R, Mora IG, Villarroel L, Alés E, Borges R, Cardenas AM. A rapid exocytosis mode in chromaffin cells with a neuronal phenotype. *J Neurochem*. 2006 Oct;99(1):29-41.
- Arias E, Ales E, Gabilan NH, Cano-Abad MF, Villarroya M, Garcia AG and Lopez MG. Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 2004; **46**:103-114.
- Basset O, Boittin FX, Cognard C, Constantin B, Ruegg UT. Bcl-2 overexpression prevents calcium overload and subsequent apoptosis in dystrophic myotubes. *Biochem J*. 2006 Apr 15;395(2):267-76.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.
- Blum D, Torch S, Nissou MF, Verna JM. A cautionary note on the use of stable transformed cells. *Apoptosis*. 2000 Apr;5(2):115-6.
- Bonilha L, Yasuda CL, Rorden C, Li LM, Tedeschi H, de Oliveira E, Cendes F. Does resection of the medial temporal lobe improve the outcome of temporal lobe epilepsy surgery? *Epilepsia*. 2007 Mar; 48 (3): 571-8.
- Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8608-18.
- Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R. Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$. A critical evaluation. *J Biol Chem*. 270 (1995) 9896-903.
- Cano-Abad Maria F "Muerte celular por sobrecarga de calcio: citoprotección por calcio-antagonistas", Tesis Doctoral, Madrid, 2000.
- Cano-Abad MF, Villarroya M, García AG, Gabilan NH, Lopez MG. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem*. 2001 Oct 26;276(43):39695-704.

- Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*. 1984 Aug 9-15;310(5977):501-2.
- Cataldi M, Lariccia V, Secondo A, di Renzo G, Annunziato L. The antiepileptic drug levetiracetam decreases the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by ATP and bradykinin in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 313 (2): 720-730.
- Chen J, Shan KR, Long YG, Wang YN, Nordberg A, Guan ZZ. Selective decreases of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells exposed to fluoride. *Toxicology* 2003; 183: 235-242.
- Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, Berridge MJ, Conway SJ, Holmes AB, Mignery GA, Velez P, Distelhorst CW. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol*. 2004 Jul 19; 166 (2): 193-203.
- Cheng EH et al. Bcl-2, Bcl-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell*. 2001; 8: 705-711.
- Chin H. Molecular biology of neuronal voltage-gated calcium channels. *Exp. Mol. Med* 1998; 30:123-130.
- Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 1985 Aug 5; 58(3): 293-7.
- Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1(8): 623-634.
- Clark RS, Chen J, Watkins SC, Kochanek PM, Chen M, Stetler RA, Loeffert JE, Graham SH. Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J Neurosci*. 1997 Dec 1; 17(23):9172-82.
- Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, Hamilton RL, Loeffert JE, Graham SH. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J*. 1999 May;13(8):813-21.
- Cleveland MV, Slatin S, Finkelstein A, Levinthal C. Structure-function relationships for a voltage-dependent ion channel: Properties of COOH-terminal fragments of the colicin E1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983 Jun; 80 (12): 3706-10.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.

- Cramer WA, Heymann JB, Schendel SL, Deriy BN, Cohen FS, Elkins PA, Stauffacher CV. Structure-function of the channel-forming colicins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995; 24: 611-41.
- Curtis BM and Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 1984; 23: 2113-2118.
- DeLorenzo RJ. The epilepsies. In WG Bradley, RB Daroff, GM Fenichel & CD – Marsden (Eds.), *Neurology in clinical practice*. 1989 Stoneham, MA: Butterworth Publishers.
- DeLorenzo RJ. The challenging genetics of epilepsy. *Epilepsy Research* 1991. Suppl 4, 3-17.
- DeLorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther.* 2005 Mar;105(3):229-66.
- Dispersyn G, Nuydens R, Connors R, Borgers M, Geerts H. Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Aug 5;1428(2-3):357-71.
- Distelhorst CW, Lam M, McCormick TS. Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca^{2+} pool depletion. *Oncogene.* 1996 May 16; 12 (10): 2051-5.
- Distelhorst CW, Shore GC. Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene.* 2004 Apr 12; 23 (16): 2875-80.
- Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Dec;16(6):663-9.
- Ellis RE, Horvitz HR. Two c. *Elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development.* 1991 Jun;112(2):591-603.
- Fasolato C, Zottini M, Clementi E, Zacchetti D, Meldolesi J, Pozzan T. Intracellular Ca^{2+} pools in PC12 cells. Three intracellular pools are distinguished by their turnover and mechanisms of Ca^{2+} accumulation, storage, and release. *J Biol Chem* 1991; 266: 20159-20167.
- Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem.* 1999 Jan 22; 274(4):2225-33.
- Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demarex N, Krause KH. Bcl2 decreases the free Ca^{2+} concentration

- within the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97: 5723-5728.
- Frazen N. Seizures and epilepsy: Hope trough research. 2000 Bethesda MD: NINDS.
- Gallego Sandín, Sonia M “Estrés reticular calcio y apoptosis en células de neurolastoma: Efectos del suero y de la albúmina” Tesis Doctoral, Madrid 2004.
- Gandia L, Albillos A, López MG, Lara B. Diversidad de canales de calcio voltaje-dependientes. En “Farmacología de los canales iónicos”. Fundación Dr. Antonio Esteve 1995: 69-76.
- García AG, Sala F, Reig JA, Viniegra S, Frías J, Fonteriz, Gandia L. Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. Nature. 1984 May 3-9;309(5963):69-71.
- García AG, Gandía L, Lopez MG and Montiel C. Calcium channels for exocytosis: functional modulation with toxins. In “*Seafood toxicity: Pharmacology, Physiology and Mode of action*”. Marcel Dekker, Inc 2000: 91-124.
- García AG, García-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, García-Sancho J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. Physiol Rev. 2006 Oct; 86(4):1093-131.
- Garthwaite G, Hajos F, Garthwaite J. Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. Neuroscience. 1986 Jun; 18(2): 437-47.
- Gil Parrado S, Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, Popp O, Bestvater F, Holloschi A, Knoch TA, Auerswald EA, Welsh K, Reed JC, Fritz H, Fuentes-Prior P, Spiess E, Salvesen GS, Machleidt W. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):27217-26.
- Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci. 2007 Jan;32(1):37-43.
- Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976; 73 (7): 2424-2428.
- Guerini D, Coletto L, Carafoli E. Exporting calcium from cells. Cell Calcium. 2005 Sep-Oct;38(3-4):281-9.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. 1981; 391: 85–100.

-
-
- Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Dec;25(12):1557-72.
- Ichimiya M, Chang SH, Liu H, Berezesky IK, Trump BF, Amstad PA Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca^{2+} mobilization. *Am J Physiol* 1998 Sep; 275(3 Pt 1):C832-9.
- Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Miyata T, Tsuji FI. Cloning and sequence analysis of cADN for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 3154-3158.
- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):4997-5002.
- Kendall JM, Sala-Newby G, Ghalaut V, Dormer RL, Campbell AK. Engineering the Ca^{2+} -activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 187:1091-1097.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
- Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, Bhalla K. Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res.* 1997 Aug 1;57(15):3115-20.
- Kuo TH, Kim H-RC, Zhu L, Yu Y, Lin H-M, Tsang W. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2 Oncogene 1998; 17: 1903-1910.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. Evidence that Bcl2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 5;91(14):6569-73.
- Li Y, King MA, Meyer EM. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated protection against ethanol-induced oxidative stress and cytotoxicity in PC12 cells. *Brain Res* 2000; 861: 165-167.
- Liu H, Bowes RCI, Van den Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca^{2+} disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 21751-21759.
- Lothman EW, Bertram III EH, Stringer JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol* 37 (1), 1-82.

- McLean AE, McLean E, Judah JD. Cellular necrosis in the liver induced and modified by drugs. *Int Rev Exp Pathol*. 1965;4:127-57.
- McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 1994 14 (6), 3413-3425.
- McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 1999 399 (6738 suppl), A15-A22.
- Meijerink JPP t(14;18), a journey to eternity. *Leukemia* 1997; 11: 2175-2187.
- Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause K-H. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca^{2+} storage and decreases store-operated Ca^{2+} influx. *J Biol Chem* 1996; 271: 9332-9339.
- Minami M, Jin KL, Nagayama T, Henshall DC, Simon RP. Bcl-w expression is increased in brain regions affected by focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett*. 2000 Feb 4; 279(3): 193-5.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. 1997 Jan 23; 385 (6614): 353-7.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo- Ibañez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J, Alvarez J. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):57-61.
- Montero M, Lobatón CD, Moreno A, Alvarez J. A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190. *FASEB J*. 2002; 16: 1955-1957.
- Montero M, Lobatón CD, Hernandez-SanMiguel E, SantoDomingo J, Vay L, Moreno A, Alvarez J. Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochem J* 2004; 384: 19-24.
- Moreno A, Lobatón CD, SantoDomingo J, Vay L, Hernandez-SanMiguel E, Rizzuto R, Montero M, Alvarez J. Calcium dynamics in catecholamine-containing secretory vesicles. *Cell Calcium* 2005; 37: 555-564.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996 May 23;381(6580):335-41.
- Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 9893-8.

- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14681-6.
- Nuydens R, Dispersyn G, VanDen Keiboom G, de Jong M, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H. Bcl-2 protects against apoptosis-related microtubule alterations in neuronal cells. *Apoptosis*. 2000a Feb;5(1):43-51.
- Nuydens R, Dispersyn G, VanDen Keiboom G, de Jong M, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H. Bcl-2 protects neuronal cells against taxol-induced apoptosis by inducing multi-nucleation. *Apoptosis*. 2000b Oct;5(4):335-43.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):609-19.
- Padar S, van Breemen C, Thomas DW, Uchizono JA, Livesey JC, Rahimian R. Differential regulation of calcium homeostasis in adenocarcinoma cell line A549 and its Taxol-resistant subclone. *Br J Pharmacol*. 2004 May; 142 (2): 305-16.
- Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY. Bcl-2-mediated alteration in endoplasmic reticulum Ca^{2+} analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 14;101(50):17404-9.
- Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. Reduced loading of intracellular Ca^{2+} stores and downregulation of capacitative Ca^{2+} influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 2000 Mar 6; 148 (5): 857-62.
- P. Pinton, D. Ferrari, E. Rapizzi, F. Di Virgilio, T. Pozzan, R. Hirsuto, The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl2 action. *EMBO J*. 20 (2001) 2690-701.
- Pizzo P, Fasolato C, Pozzan T. Dynamic properties of an inositol 1,4,5-trisphosphate- and thapsigargin-insensitive Ca^{2+} pool in mammalian cell lines. *J Cell Biol* 1997 Jan 27; 136 (2): 355-366.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000 Nov;157(5):1415-30.
- Ren Ke, Puig V, Papke RL, Itoh Y, Hughes JA, Meyer EM. Multiple Calcium channels and kinases mediate $\alpha 7$ nicotinic receptor neuroprotection in PC12 cells. *J Neurochem* 2005; 94: 926-933.

-
-
- Reynolds JE, Eastman A. Intracellular calcium stores are not required for Bcl-2-mediated protection from apoptosis. *J Biol Chem*. 1996 Nov 1;271(44):27739-43.
- Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*. 358 (1992) 325-7.
- Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E, Avendano C. Reduction of infarct size by intra-arterial nimodipine administered at reperfusion in a rat model of partially reversible brain focal ischemia. *Stroke*. 1995 Oct;26(10):1888-92.
- Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T. Looking forward to seeing calcium *Nature reviews* 2003; 4: 579-585.
- Ruiz Nuño, Ana. "Esclarecimiento del mecanismo de acción de la dotarizina como agente anti migrañoso", Tesis doctoral, Madrid Julio 2001.
- Sato, T, Hanada M, Bodrug S, Irie S, Iwama N, Boise LH, Thompson CB, Golemis E, Fong L, Wang HG et al. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27;91(20):9238-42.
- Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 1979 Nov 9;206(4419):700-2.
- Schlaepfer WW, Bunge RP. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J Cell Biol*. 1973 Nov; 59 (2 Pt 1):456-70.
- Schindler AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1996; 16: 6125-6133.
- Schindler CK, Shinoda S, Simon RP, Henshall DC. Subcellular distribution of Bcl-2 family proteins and 14-3-3 within the hippocampus during seizure-induced neuronal death in the rat. *Neurosci Lett*. 2004 Feb 19;356(3):163-6.
- Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 Oct 14; 94 (21): 11357-62.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15;92(17):7834-8.
- Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*. 1991 Nov 29; 67 (5): 879-88.

-
-
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 May 13; 94 (10): 5113-8.
- Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*. 1998 May;5(5):372-80.
- Skok MV, Voitenko LP, Voitenko SV, Lykhmus EY, Kalashnik EN, Litvin TI, Tzartos SJ, Skok VL. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurons as determined with subunit-specific anti- α (181-192) peptide antibodies. *Neurosci* 1999; 93 (4): 1427-1436.
- Sobrado M, López MG, Carceller F, García AG, Roda JM. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2003; 118(1):107-13.
- Taylor SC, Peers C. Three distinct Ca^{2+} influx pathways couple acetylcholine receptor activation to catecholamine secretion from PC12 cells. *J Neurochem* 2000; 75: 1583-1589.
- Tornero D, Ceña V, Gonzalez-García C, Jordán J. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Rev Neurol* 2002; 35: 354-361.
- Tully K, Treistman SN. Distinct intracellular calcium profiles following influx through N- versus L-Type calcium channels: Role of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *J Neurophysiol* 2004 92: 135-143.
- Usowicz MM, Porzig H, Becker C, Reuter H. Differential expression by nerve growth factor of two types of Ca^{2+} channels in rat pheochromocytoma cell lines. *J Physiol*. 1990 Jul;426:95-116.
- Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, Roudbaraki M, Mauroy B, Wuytack F, Prevarskaya N. Bcl-2-dependent modulation of Ca^{2+} homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 2002; 1:169-79.
- Vasington FD. Calcium ion uptake by fragments of rat liver mitochondria and its dependence on electron transport. *J Biol Chem*. 1963 May; 238: 1841-7.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988 Sep 29; 335 (6189): 440-2.
- Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1955-7.

- Villalobos C, Nuñez L, Montero M, García AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J, García-Sancho J. Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J.* 2002 Mar; 16 (3): 343-53.
- Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: supression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis *Exp Neurol* 1999; 155: 302-314.
- Zhang YL, Cramer WA. Constraints imposed by protease accesibililty on the trans-membrane and surface topography of the colicin E1 ion channel. *Protein Sci* 1992 Dec; 1 (12): 1666-76.
- Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 15;90(10):4533-7.
- Zimmerman AN, Hulsmann WC. Paradoxical influence of ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature.* 1966 Aug 6;211(5049):646-7.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death.*Pharmacol Ther.* 2001 Oct;92(1):57-70.

